

09 MAR 2005

10/527258

PCT/JP03/09901

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

05.08.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 9月12日

出願番号
Application Number: 特願2002-267163
[ST. 10/C]: [JP2002-267163]

出願人
Applicant(s): 吳羽化学工業株式会社
山本 三毅夫
山本 直樹

REC'D 03 OCT 2003

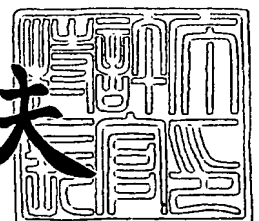
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月19日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【あて先】 特許庁長官 殿

【整理番号】 0701004001

【提出日】 平成14年 9月12日

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県所沢市並木三丁目 2 番 4 - 5 0 3 号

 【氏名】 山本 三毅夫

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都大田区南千束二丁目 1 6 番 5 号

 【氏名】 山本 直樹

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都練馬区春日町四丁目 8 番 1 6 号

 【氏名】 広瀬 国孝

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都新宿区百人町三丁目 2 6 番 1 - 4 0 3 号

 【氏名】 酒井 潤

【特許出願人】

 【識別番号】 000001100

 【氏名又は名称】 呉羽化学工業株式会社

【特許出願人】

 【識別番号】 391048371

 【氏名又は名称】 山本 三毅夫

【特許出願人】

 【識別番号】 598002121

 【氏名又は名称】 山本 直樹

【代理人】

【識別番号】 100097456

【弁理士】

【氏名又は名称】 石川 徹

【選任した代理人】

【識別番号】 100102923

【弁理士】

【氏名又は名称】 加藤 雄二

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 094216

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 発現遺伝子同定用cDNAタグの作成方法、及び該cDNAタグを用いる遺伝子発現解析方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 発現遺伝子同定用cDNAタグの作成方法であって：

相補的デオキシリボ核酸(cDNA)を準備し、

該cDNAをII型制限酵素で切断してcDNA断片を作成し；

該cDNA断片に、第1 IIS型制限酵素の認識配列を含み、かつ前記II型制限酵の切断末端との連結部分に第2 IIS型制限酵素の認識配列を生じるリンカーXを連結して、リンカーX-cDNA断片連結物を作成し；

該リンカーX-cDNA断片連結物を第2 IIS型制限酵素で切断して、リンカーX-cDNAタグ連結物を作成し；

該リンカーX-cDNAタグの第2 IIS型制限酵素による切断末端に、第3 IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーYを連結して、リンカーX-cDNAタグーリンカーY連結物を作成し；

該リンカーX-cDNAタグーリンカーY連結物を増幅し；かつ

得られた増幅産物を第1 IIS型制限酵素及び第3 IIS型制限酵素で同時にあるいは順次に切断して、発現遺伝子同定用cDNAタグを得る前記作成方法。

【請求項2】 発現遺伝子同定用cDNAタグの作成方法であって：

相補的デオキシリボ核酸(cDNA)を準備し、

該cDNAをII型制限酵素で切断してcDNA断片を作成し；

該cDNA断片に、第1 IIS型制限酵素及び第2 IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーXを連結して、リンカーX-cDNA断片連結物を作成し；

該リンカーX-cDNA断片連結物を第2 IIS型制限酵素で切断して、リンカーX-cDNAタグ連結物を作成し；

該リンカーX-cDNAタグの第2 IIS型制限酵素による切断末端に、第1 IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーYを連結して、リンカーX-cDNAタグーリンカーY連結物を作成し；

該リンカーX-cDNAタグーリンカーY連結物を増幅し；かつ

得られた増幅産物を第1 IIS型制限酵素で切断して、発現遺伝子同定用cDNAタグを得る前記作成方法。

【請求項3】 発現遺伝子同定用cDNAタグの作成方法であって：

相補的デオキシリボ核酸(cDNA)を準備し、

該cDNAをII型制限酵素で切断してcDNA断片を作成し；

該cDNA断片に、第1 IIS型制限酵素及び第2 IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーXを連結して、リンカーX-cDNA断片連結物を作成し；

該リンカーX-cDNA断片連結物を第2 IIS型制限酵素で切断して、リンカーX-cDNAタグ連結物を作成し；

該リンカーX-cDNAタグの第2 IIS型制限酵素による切断末端に、第3 IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーYを連結して、リンカーX-cDNAタグ-リンカーY連結物を作成し；

該リンカーX-cDNAタグ-リンカーY連結物を増幅し；かつ

得られた増幅産物を第1 IIS型制限酵素及び第3 IIS型制限酵素で同時にあるいは順次に切断して、発現遺伝子同定用cDNAタグを得る前記作成方法。

【請求項4】 さらに、II型制限酵素で切断したcDNA断片の末端を、前記リンカーXが結合可能な状態に処理する工程を含む、請求項1～3のいずれか1項記載記載の方法。

【請求項5】 さらに前記リンカーX-cDNA断片連結物を純化する工程を含む、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

【請求項6】 さらに、前記リンカーX-cDNA断片連結物のcDNA断片の末端を、前記リンカーYが結合可能な状態に処理する工程を含む、請求項1～3のいずれか1項記載記載の方法。

【請求項7】 さらに、前記リンカーX-cDNA断片連結物のcDNA断片の末端を、前記リンカーYが結合可能な状態に処理する工程を含む、請求項5記載の方法。

【請求項8】 得られた発現遺伝子同定用cDNAタグを分離する工程を含む、請求項1～3のいずれか1項記載記載の方法。

【請求項9】 被検細胞由来のmRNAからcDNAを調製する、請求項1～3のい

ずれか 1 項記載記載の方法。

【請求項 10】 オリゴdTプライマーとして、固相固定化オリゴdTプライマーを用いて、被検細胞由来のmRNAからcDNAを調製する、請求項 1～3 のいずれか 1 項記載記載の方法。

【請求項 11】 固相固定化オリゴdTプライマーが、ラテックスビーズ又はマグネットビーズ固定化オリゴdTプライマーである、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】 前記II型制限酵素が、4 塩基対の認識部位を有する、請求項 1～3 のいずれか 1 項記載記載の方法。

【請求項 13】 前記II型制限酵素が、AfaI, AluI, CfuI, CviRI, DpnI, E saBC3I, HpyBI, HpyCH4V, HpyF44III, MltI, PlaAII, RsaI, BfaI, Csp6I, CviA II, CviQI, CviRII, FgoI, HpyCH4IV, MaeI, MaeII, MthZI, RmaI, PpaAII, Tsp 32I, Tsp32II, TaqI, TthHB8I, XspI, BspKT6I, BstKTI, HpyCH4I, AspMDI, Bce 243I, Bfi57I, BfuCI, Bme12I, BscFI, Bsp67I, Bsp105I, Bsp143I, Bsp2095I, BspAI, BspFI, BspJI, Bst19II, BstENII, BtkII, CacI, CcyI, ChaI, CpfI, CviAI, DpnII, FatI, FnuCI, FnuEI, HacI, Kzo9I, LlaAI, MboI, MgoI, MkrAI, N deII, NlaII, NmeCI, NphI, RalF40I, Sau3AI, SauMI, Sth368I, ChaI, Hn1II, Hsp92II, NlaIII, TaiI, TscI及びTsp49Iからなる群から選ばれたものである、請求項 1～3 のいずれか 1 項記載記載の方法。

【請求項 14】 前記第 1 IIS型制限酵素が、MmeI, AcuI, Bce83I, BpmI, B puEI, BsgI, BspKT5I, Eco57I, Eco57MI, GsuI, BsmFI, BspLU11III, Bst0Z616I, StsI, BceAI, BstPZ418I, FokI, BceFI, AlwXI, BbvI, Bsp423I, BseKI, BseX I, Bsp423I, Bst12I, Bst71I, BstVII, RleAI, AceIII, Bbr7I, EciI, TspDTI, TspGWI, Tth111III, HgaI, BseMII, BseRI, BspST5I, LweI, PhaI, SfaNI, AarI, Acc36I, BfuAI, BspMI, BveI, Sth132I, SspD5I, AsuHPI, HphI, MboII, NcuI, MnlI, BbsI, BbvII, BbsI, Bbv16II, BpiI, BpuAI, Bsc91I, BspBS31I, BspIS4 I, BspTS514I, BstBS32I, BstTS5I, BstV2I, Bme585I, BscAI, Bst19I, BstFZ43 8I, FauI, SmuI BciVI, BfuI, 及びHpyAVからなる群から選ばれたものである、請求項 1～3 のいずれか 1 項記載記載の方法。

【請求項 15】 前記第 1 IIS型制限酵素が、MmeI, AcuI, Bce83I, BpmI, B

puEI, BsgI, BspKT5I, Eco57I, Eco57MI, GsuI, BsmFI, BspLU11III, BstOZ616I, StsI, BceAI, BstPZ418I, FokI, BceFI, AlwXI, BbvI, Bsp423I, BseKI, BseXI, Bsp423I, Bst12I, Bst71I, BstVII, RleAI, AceIII, Bbr7I, EciI, TspDTI, TspGWI, Tth111III, HgaI, BseMII, 及びBseRIからなる群から選ばれたものである、請求項1～3のいずれか1項記載記載の方法。

【請求項16】 前記第1 IIS型制限酵素が、MmeI, AcuI, Bce83I, BpmI, BpuEI, BsgI, BspKT5I, Eco57I, Eco57MI及びGsuIからなる群から選ばれたものである、請求項1～3のいずれか1項記載記載の方法。

【請求項17】 前記第2 IIS型制限酵素がMmeI, MmeI, AcuI, Bce83I, BpmI, BpuEI, BsgI, BspKT5I, Eco57I, Eco57MI, GsuI, BsmFI, BspLU11III, BstOZ616I, StsI, BceAI, BstPZ418I, FokI, BceFI, AlwXI, BbvI, BseKI, BseXI, Bsp423I, Bst12I, Bst71I, BstVII, RleAI, AceIII, Bbr7I, EciI, TspDTI, TspGWI, Tth111III, HgaI, BseMII, BseRI, BspST5I, LweI, PhaI, SfaNI, AarI, Acc36I, BfuAI, BspMI, BveI, Sth132I, SspD5I, AsuHPI, HphI, MboII, NcuI, MnlI, BbsI, BbvII, BbsI, Bbv16II, BpiI, BpuAI, Bsc91I, BspBS31I, BspIS4I, BspTS514I, BstBS32I, BstTS5I, BstV2I, Bme585I, BscAI, Bst19I, BstFZ438I, FauI, SmuI BciVI, BfuI, 及びHpyAVからなる群から選ばれたものである、請求項1～3のいずれか1項記載記載の方法。

【請求項18】 前記第2 IIS型制限酵素が、MmeI, AcuI, Bce83I, BpmI, BpuEI, BsgI, BspKT5I, Eco57I, Eco57MI, GsuI, BsmFI, BspLU11III, BstOZ616I, StsI, BceAI, BstPZ418I, FokI, BceFI, AlwXI, BbvI, BseKI, BseXI, Bsp423I, Bst12I, Bst71I, BstVII, RleAI, AceIII, Bbr7I, EciI, TspDTI, TspGWI, Tth111III, HgaI, BseMII及びBseRIからなる群から選ばれたものである、請求項1～3のいずれか1項記載記載の方法。

【請求項19】 前記第2 IIS型制限酵素が、MmeI, AcuI, Bce83I, BpmI, BpuEI, BsgI, BspKT5I, Eco57I, Eco57MI, 及びGsuIからなる群から選ばれたものである、請求項1～3のいずれか1項記載記載の方法。

【請求項20】 前記第3 IIS型制限酵素がMmeI, MmeI, AcuI, Bce83I, BpmI, BpuEI, BsgI, BspKT5I, Eco57I, Eco57MI, GsuI, BsmFI, BspLU11III, BstOZ

616I, StsI, BceAI, BstPZ418I, FokI, BceFI, AlwXI, BbvI, BseKI, BseXI, Bsp423I, Bst12I, Bst71I, BstV1I, RleAI, AceIII, Bbr7I, EciI, TspDTI, TspGWI, Tth111III, HgaI, BseMII, BseRI, BspST5I, LweI, PhaI, SfaNI, AarI, Acc36I, BfuAI, BspMI, BveI, Sth132I, SspD5I, AsuHPI, HphI, MboII, NcuI, MnlI, BbsI, BbvII, BbsI, Bbv16II, BpiI, BpuAI, Bsc91I, BspBS31I, BspIS4I, BspTS514I, BstBS32I, BstTS5I, BstV2I, Bme585I, BscAI, Bst19I, BstFZ438I, FauI, SmuI BciVI, BfuI, 及びHpyAVからなる群から選ばれたものである、請求項1、又は3のいずれか1項記載記載の方法。

【請求項21】 前記第3IIS型制限酵素が、MmeI, AcuI, Bce83I, BpmI, BpuEI, BsgI, BspKT5I, Eco57I, Eco57MI, GsuI, BsmFI, BspLU111III, BstOZ616I, StsI, BceAI, BstPZ418I, FokI, BceFI, AlwXI, BbvI, BseKI, BseXI, Bsp423I, Bst12I, Bst71I, BstV1I, RleAI, AceIII, Bbr7I, EciI, TspDTI, TspGWI, Tth111III, HgaI, BseMII及びBseRIからなる群から選ばれたものである、請求項1、又は3のいずれか1項記載の方法。

【請求項22】 前記第3IIS型制限酵素が、MmeI, AcuI, Bce83I, BpmI, BpuEI, BsgI, BspKT5I, Eco57I, Eco57MI, 及びGsuIからなる群から選ばれたものである、請求項1記載の方法。

【請求項23】 発現遺伝子同定用タグの長さが6～25塩基対である、請求項1～3のいずれか1項記載記載の方法。

【請求項24】 発現遺伝子同定用タグの長さが10～25塩基対である、請求項1～3のいずれか1項記載記載の方法。

【請求項25】 発現遺伝子同定用タグの長さが10～16塩基対である、請求項1～3のいずれか1項記載記載の方法。

【請求項26】 第1IIS型制限酵素及び第2IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーX。

【請求項27】 配列番号7及び8の塩基配列を有する、請求項26記載のリンカーX。

【請求項28】 II型制限酵素で切断されたcDNA断片と、第1IIS型制限酵素及び第2IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーXとを含む、リンカーX-c

DNA断片連結物。

【請求項 29】 請求項 28 記載のリンカー X-cDNA断片連結物の切断末端に、第 3 IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカー Y を連結したリンカー X-cDNA タグーリンカー Y 連結物。

【請求項 30】 配列番号 19 の塩基配列及びその相補鎖を含む、請求項 29 記載のリンカー X-cDNA タグーリンカー Y 連結物。

【請求項 31】 請求項 1～3 のいずれか 1 項記載記載の方法で得られた発現遺伝子同定用 cDNA タグライブラリー。

【請求項 32】 請求項 31 の同定用 cDNA タグライブラリーを、検出すべき核酸を固定した検出装置に接触させることを特徴とする遺伝子発現解析方法。

【請求項 33】 該検出装置が、同定すべき一群の核酸を各スポットに有する DNA チップである、請求項 32 記載の遺伝子発現解析方法。

【請求項 34】 同定すべき一群の核酸を含むライブラリーを、請求項 1～3 のいずれか 1 項で得られた同定用 cDNA タグを固定した検出装置に、接触させることを特徴とする遺伝子発現解析方法。

【請求項 35】 該検出装置が、請求項 1～3 のいずれか 1 項で得られた同定用 cDNA タグを各スポットに有する DNA チップである、請求項 34 記載の遺伝子発現解析方法。

【請求項 36】 請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の方法で得られた発現遺伝子同定用タグを互いに連結する工程、及び該連結物の塩基配列を決定する工程を含む発現遺伝子解析方法。

【請求項 37】 該連結物が 3～200 の発現遺伝子同定用タグを含む、請求項 36 記載の方法。

【請求項 38】 該連結物が 3～80 の発現遺伝子同定用タグを含む、請求項 36 記載の方法。

【請求項 39】 該連結物が 16～40 の発現遺伝子同定用タグを含む、請求項 36 記載の方法。

【請求項 40】 該連結物の配列を決定し、その配列からそれぞれの cDNA タグの配列を決定する、請求項 37 記載の定性的発現遺伝子解析方法。

【請求項 4 1】 該連結物の配列を決定し、その配列からそれぞれのcDNAタグの配列及び出現頻度を求める、請求項 3 7 記載の定量的発現遺伝子解析方法。

【請求項 4 2】 請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の方法で得られたcDNAタグの連結物であって、該cDNAタグの間にスペーサー配列がない連結物。

【請求項 4 3】 3～200 のcDNAタグを含む、請求項 4 2 記載の連結物。

【請求項 4 4】 3～80 の該cDNAタグを含む、請求項 4 2 記載の連結物。

【請求項 4 5】 16～40 の該 cDNAタグを含む、請求項 4 2 記載の連結物。

【請求項 4 6】 請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の方法で得られたcDNAタグの連結物であって、該cDNAタグの間にスペーサー配列がある連結物。

【請求項 4 7】 3～200 のcDNAタグを含む、請求項 4 6 記載の連結物。

【請求項 4 8】 3～80 の該cDNAタグを含む、請求項 4 6 記載の連結物。

【請求項 4 9】 16～40 の該cDNAタグを含む、請求項 4 6 記載の連結物。

【請求項 5 0】 発現遺伝子同定用cDNAタグ作成キットであって、II型制限酵素、第 1 IIS 型制限酵素、第 2 IIS 型制限酵素、第 3 IIS 型制限酵素、第 1 IIS 型制限酵素の認識配列を含み、かつ前記II型制限酵の切断末端との連結部分に第 2 IIS 型制限酵素の認識配列を生じるリンカー X、及び第 3 IIS 型制限酵素の認識配列を含むリンカー Y を含む、該キット。

【請求項 5 1】 発現遺伝子同定用cDNAタグ作成キットであって、II型制限酵素、第 1 IIS 型制限酵素、第 2 IIS 型制限酵素、第 1 IIS 型制限酵素および第 2 IIS 型制限酵素の認識配列を含むリンカー X、第 1 IIS 型制限酵素の認識配列を含むリンカー Y、を含む該キット。

【請求項 5 2】 発現遺伝子同定用cDNAタグ作成キットであって、II型制限酵素、第 1 IIS 型制限酵素、第 2 IIS 型制限酵素、第 3 IIS 型制限酵素、第 1 IIS 型制限酵素および第 2 IIS 型制限酵素の認識配列を含むリンカー X、及び第 3 IIS 型制限酵素の認識配列を含むリンカー Y を含む、該キット。

【請求項 5 3】 さらにリンカー X にハイブリダイズするプライマー X、及びリンカー Y にハイブリダイズするプライマー Y を含む、請求項 5 0～5 2 のいずれか 1 項記載の該キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、発現遺伝子同定用cDNAタグの作成方法、該cDNAタグライブラリー、及び遺伝子発現解析方法に関するものである。さらに詳細に述べると、発現遺伝子産物であるmRNA、該mRNAに対するcDNA又はそのcDNA断片の特定領域に対応する、同定用cDNAタグを作成する方法、及び該cDNAタグを利用した遺伝子発現解析方法に関するものである。該遺伝子発現解析方法は、該cDNAタグをそのまま用いる直接的な方法と、該cDNAタグの連結物を用いる間接的な方法とを含んでいる。

【0002】

【従来の技術】

各生物種は独自のゲノム配列に基づく、固有の遺伝子発現パターンを有し、また、生物の種が同一でも、細胞の分化の程度、増殖、老化などの生理的状态や、癌化、感染症、免疫病などの各種病的状態などにより、正常な状態と比べ異なる遺伝子発現パターンを有すると考えられている。したがって、このような遺伝子発現パターンを確立し、細胞間の遺伝子発現パターンを相互に比較することができれば、適切な治療ターゲットの同定、遺伝子治療用の候補遺伝子の同定、組織タイピング、法的な遺伝子確認、疾病関連遺伝子の位置決定、診断・予診用のインジケータ遺伝子の同定など、遺伝子発現パターンの幅広い応用が可能になる。

【0003】

従来、遺伝子発現を評価するため、ノーザンブロットイング法、RNアーゼプロテクション法、及び逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 分析法 (Alwineら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、74:5550、1977; Zinnら、Cell、34:865、1983; Veresら、Science、237:415、1987年)、さらに遺伝子を検索するための有用なエクспレスド・シーケンス・タグ (expressed sequence tag: EST) 法 (Adamsら、Science 252:1656、1991年; Adamsら、Nature、355: 632、1992年; Okuboら、Nature Genetics、2:173、1992年) などが開発されたが、一度に限られた数の遺伝子しか評価できなかった。例えば、Okuboらは二本鎖cDNAを4塩基

認識酵素Sau3AIで切断し、mRNAの3'末端部分だけからなるcDNAライブラリーを得て、これをクローニングしてランダムに塩基配列決定を行い遺伝子発現プロフィールを得る方法を開発した[Nature Genet. 2、173(1992年)]が、この方法で得られるそれぞれのクローンの長さは平均約300塩基であり、配列決定はクローンずつ行わねばならず、このため最終的に配列決定されたmRNAの総数は一つの細胞種当たりわずか1000個程度であって、細胞における真の遺伝子発現パターンからは程遠いものであった。また、これらの方法は、大量の原材料（例えば、ヒトの組織）が必要なこと、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を繰り返すためバイアスがかかること、結果に再現性がないこと等の理由により、研究室で用いられているに過ぎないのが現状であった。

【0004】

近年、発現された遺伝子の領域に対応する転写産物の限定領域を同定することにより、多数の転写産物を分析することができる遺伝子発現の逐次分析（serial analysis of gene expression: SAGE）法が開発された（国際公開公報W097/10363、米国特許出願第5,695,937号及び第5,866,330号）。この方法では、試料中の各cDNAに対応する短いヌクレオチド配列が二量体化された「ジタグ」（ditag）と称するタグを調製し、このジタグを鎖状に連結して単一の連結物（コンカテマー）としてクローン化しタグの配列決定により遺伝子発現パターンを明らかにするものである。このSAGE法では、試料中の各cDNAに対応する単一の発現遺伝子同定用cDNAタグを得ることはできず、また一度に同定できる発現遺伝子の数は連結物が含まれるジタグの限界から1000以下、通常400以下である。

【0005】

本発明者らは、このような従来の遺伝子発現パターンなどを解析する方法の欠点、及び低い解析限界を克服するため、発現遺伝子同定用cDNAタグの作成方法、及び該cDNAタグを用いる遺伝子発現解析方法を開発した（国際特許出願第PCT/JP02/02338号）。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、本発明者らが先に出願した国際特許出願第PCT/JP02/02338号にかか

る、発現遺伝子同定用cDNAタグの作成方法、及び遺伝子発現解析方法に対し、使用できる制限酵素の選択の幅を拡げ、使用するリンカーの製造を容易にするなどの改良を加えた該cDNAタグの作成方法、及び遺伝子発現解析方法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明は、各生物種に固有な遺伝子発現パターン、及び細胞の生理的状态、発生段階、各種病的状態などにおける特有な遺伝子発現パターンの効率的な解析を可能にする、発現遺伝子同定用cDNAタグの作成方法、及び該同定用タグを用いる遺伝子発現解析方法を提供する。本発明の方法は、従来の技術に比べ、遺伝子発現の解析に要する細胞試料の量が少なくて済み、効率的で、かつ信頼度の高いものである。

【0008】

すなわち、本発明が提供するものは、発現遺伝子同定用cDNAタグの作成方法であって：相補的デオキシリボ核酸(cDNA)を準備し；該cDNAをII型制限酵素で切断してcDNA断片を作成し；該cDNA断片に、第1 IIS型制限酵素の認識配列を含み、かつ前記II型制限酵の切断末端との連結部分に第2 IIS型制限酵素の認識配列を生じるリンカーXを連結して、リンカーX-cDNA断片連結物を作成し；該リンカーX-cDNA断片連結物を第2 IIS型制限酵素で切断して、リンカーX-cDNAタグ連結物を作成し；該リンカーX-cDNAタグの第2 IIS型制限酵素による切断末端に、第3 IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーYを連結して、リンカーX-cDNAタグ-リンカーY連結物を作成し；該リンカーX-cDNAタグ-リンカーY連結物を増幅し；かつ、得られた増幅産物を第1 IIS型制限酵素及び第3 IIS型制限酵素で同時にあるいは順次に切断して、発現遺伝子同定用cDNAタグを得る前記作成方法である。

【0009】

また、本発明が提供するものは、発現遺伝子同定用cDNAタグの作成方法であって：相補的デオキシリボ核酸(cDNA)を準備し；該cDNAをII型制限酵素で切断してcDNA断片を作成し；該cDNA断片に、第1 IIS型制限酵素及び第2 IIS型制限酵素

の認識配列を含むリンカーXを連結して、リンカーX-cDNA断片連結物を作成し；該リンカーX-cDNA断片連結物を第2 IIS型制限酵素で切断して、リンカーX-cDNAタグ連結物を作成し；該リンカーX-cDNAタグの第2 IIS型制限酵素による切断末端に、第1 IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーYを連結して、リンカーX-cDNAタグ-リンカーY連結物を作成し；該リンカーX-cDNAタグ-リンカーY連結物を増幅し；かつ、得られた増幅産物を第1 IIS型制限酵素で切断して、発現遺伝子同定用cDNAタグを得る前記作成方法である。

【0010】

さらに、本発明は、発現遺伝子同定用cDNAタグの作成方法であって：相補的デオキシリボ核酸(cDNA)を準備し；該cDNAをII型制限酵素で切断してcDNA断片を作成し；該cDNA断片に、第1 IIS型制限酵素及び第2 IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーXを連結して、リンカーX-cDNA断片連結物を作成し；該リンカーX-cDNA断片連結物を第2 IIS型制限酵素で切断して、リンカーX-cDNAタグ連結物を作成し；該リンカーX-cDNAタグの第2 IIS型制限酵素による切断末端に、第3 IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーYを連結して、リンカーX-cDNAタグ-リンカーY連結物を作成し；該リンカーX-cDNAタグ-リンカーY連結物を増幅し；かつ、得られた増幅産物を第1 IIS型制限酵素及び第3 IIS型制限酵素で同時にあるいは順次に切断して、発現遺伝子同定用cDNAタグを得る前記作成方法を提供する。

【0011】

また、本発明は、第1 IIS型制限酵素及び第2 IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーXを提供する。

さらに、本発明は、前記発現遺伝子同定用cDNAタグの作成方法で得られたcDNAタグライブラリーを、検出すべき核酸を固定した検出装置に接触させることを特徴とする遺伝子発現解析方法を提供する。

さらに、本発明は、同定すべき一群の核酸を含むライブラリーを、本発明で得られた同定用cDNAタグを固定した検出装置に、接触させることを特徴とする遺伝子発現解析方法を提供する。これらの検出装置としてDNAチップを用いることができる。

さらに、本発明は、前記発現遺伝子同定用cDNAタグの作成方法で得られた該タグを互いに連結する工程、及び該連結物の塩基配列を決定する工程を含む発現遺伝子解析方法を提供する。該解析方法には、該連結物の配列を決定し、その配列からそれぞれのcDNAタグの配列を決定する定性的解析方法、及びその配列からそれぞれのcDNAタグの配列及び出現頻度を求める、定量的発現遺伝子解析方法が含まれる。

【0012】

さらに、本発明が提供するものは、発現遺伝子同定用cDNAタグ作成キットであって、II型制限酵素、第1 IIS型制限酵素、第2 IIS型制限酵素、第3 IIS型制限酵素、第1 IIS型制限酵素の認識配列を含み、かつ前記II型制限酵素の切断末端との連結部分に第2 IIS型制限酵素の認識配列を生じるリンカーX、及び第3 IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーYを含む、該キットである。

さらに、本発明が提供するものは、発現遺伝子同定用cDNAタグ作成キットであって、II型制限酵素、第1 IIS型制限酵素、第2 IIS型制限酵素、第1 IIS型制限酵素および第2 IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーX、第1 IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーY、を含む該キットである。

【0013】

さらに、本発明が提供するものは、発現遺伝子同定用cDNAタグ作成キットであって、II型制限酵素、第1 IIS型制限酵素、第2 IIS型制限酵素、第3 IIS型制限酵素、第1 IIS型制限酵素および第2 IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーX、及び第3 IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーYを含む、該キットである。

なお、発現遺伝子同定用タグ (Expressed Gene Identification cDNA Tag) を、必要に応じてEGI cDNA タグ又はEGIタグという略号で表す。

ここで、本発明は基本的な原理について説明する。

第一は、遺伝子転写産物内の一定の位置から単離された短いヌクレオチド配列のタグが、その転写産物を同定するのに十分な情報量を含むということである。例えば、9 bpの配列のタグは、4の9乗、すなわち262,144種の配列が可能であり、これに対応する同数の転写産物を識別することができる。一方、ヒト・ゲノ

ムは約80,000~200,000 の転写産物をコードすると示唆されている (Fieldsら、Nature Genetics、7:345、1994年)。したがって、理論的には9 bpの配列のタグを得られれば、すべてのヒト遺伝子転写産物を同定することができる。

【0014】

下等な真核生物や原核生物の場合、ゲノムによりコードされる転写産物の数はより少ないので、タグのサイズをもっと短くすることができる。例えば、酵母では転写産物を識別するのに6~7 bp ほどの短いタグで十分である。本発明の方法は、それぞれの遺伝子転写産物に対応する、様々なヌクレオチド長さを有する、単一の発現遺伝子同定用cDNAタグを提供するので、遺伝子発現パターンを解析するのに有益である。

【0015】

第二は、上流及び下流をリンカーに挟まれた単一の短いcDNAタグを1回増幅処理するだけで、発現遺伝子の解析を行なうことができるので、増幅及び／又はクローニングに起因するバイアスが起り難いことである。

第三は、本発明の方法により得られたEGIcDNAタグライブラリーを利用して、EGIcDNAタグ配列に対応するcDNAを定性的、また定量的に測定し、対応する発現遺伝子のパターンを調べられることである。

第四は、本発明の方法で作成された同定用cDNAタグにより、スパーサー配列の無い、又は有る連結物（コンカテマー）を作成し、必要に応じてベクターなどを用いてクローン化し連続的、かつ効率的に解析することができる。特に、該cDNAタグがそれぞれ独立した配列なので、連結物の配列を解析するのも容易であるし、連結物から単独のcDNAタグを単離することも容易に行なうことができる。

なお、本発明と先に記載したSAGE法とは、短いヌクレオチド配列のタグが転写産物を同定するのに十分な情報量を含むという第一原理を応用する点で共通する。しかし、SAGE法は、「ジタグ」(ditag) と称する二量体化されたタグを利用するものであり、本発明で作成される単一の同定用cDNAタグ、そのライブラリー、単一の同定用cDNAタグからなる連続体を作成しないという点で相違する。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明の好ましい実施の形態による発現遺伝子同定用cDNAタグ（以下、EGIcDNAタグという。）の作成方法を、図1～6に示すフローチャートに基づき説明する。

なお、本発明の発現遺伝子同定用タグの作成方法には、主として三態様がある。すなわち、リンカーX-cDNAタグの第2 IIS型制限酵素による切断末端に、第3 IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーYを連結する工程を有する方法（本発明の実施態様1）、所定のcDNA断片に第1 IIS型制限酵素及び第2 IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーXを連結する工程を有する方法（本発明の実施態様2）、及び前記リンカーX及びリンカーYを含む両工程を組み合わせ方法（本発明の実施態様3）である。

【0017】

本発明の実施態様1のEGIcDNAタグの作成方法を、図1及び2に基づいて示すと次のとおりである。

- (1)相補的デオキシリボ核酸(cDNA)を準備し、
- (2)該cDNAをII型制限酵素RsaIで切断してcDNA断片を作成し；
- (3)該cDNA断片に、第1 IIS型制限酵素BseRIの認識配列を含み、かつ前記II型制限酵:RsaIの切断末端との連結部分に第2 IIS型制限酵素BsmFIの認識配列を生じるリンカーXを連結して、リンカーX-cDNA断片連結物を作成し；
- (4)該リンカーX-cDNA断片連結物を第2 IIS型制限酵素BsmFIで切断して、リンカーX-cDNAタグ連結物を作成し；
- (5)必要に応じて該リンカーX-cDNAタグ連結物を純化し；
- (6)必要に応じて該リンカーX-cDNAタグ連結物のcDNAタグの末端を、第3 IIS型制限酵素EciIの認識配列を含むリンカーYが結合可能な状態に処理した後、(7)該リンカーX-cDNAタグの第2 IIS型制限酵素BsmFIによる切断末端に、第3 IIS型制限酵素EciIの認識配列を含むリンカーYを連結して、リンカーX-cDNAタグ-リンカーY連結物を作成し；
- (8)該リンカーX-cDNAタグ-リンカーY連結物を増幅し；かつ
- (9)得られた増幅産物を第1 IIS型制限酵素BseRI及び第3 IIS型制限酵素EciIで同時、又は順次切断して、発現遺伝子同定用cDNAタグを得て、

(10)必要に応じて、得られた発現遺伝子同定用cDNAタグを分離することを含む、EGIcDNAタグの作成方法。

【0018】

なお、説明を容易にするため、本発明の実施態様1では各制限酵素を具体的に記載しているが、もちろん、幅広く、様々な制限酵素を使用できる。実施態様1で用いるリンカーXは、第1IIS型制限酵素の認識配列を含み、かつII型制限酵素の切断末端との連結部分に第2IIS型制限酵素の認識配列を生じるリンカーであり、リンカーYは、第3IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーである。

なお、実施態様1で用いるリンカーX、リンカーY、プライマーX及びプライマーYのそれぞれの配列の例を下記に示す。

【0019】

リンカーX:

5'---NNNNNNNGAGGAGNNNNNGGG---3' (配列番号1)

3'---NNNNNNNCTCCTCNNNNNCCC---5' (配列番号2)

リンカーY:

5'---CNNNNNNNNNTCCGCCNNNNNNN---3' (配列番号3)

3'---TGNNNNNNNNNAGGCGGNNNNNNN---5' (配列番号4)

プライマーX:

5'---NNNNNNNGAGGAGNNNNNGGGAC---3' (配列番号5)

プライマーY:

3'---TGNNNNNNNNNAGGCGGNNNNNNN---5' (配列番号6)

本発明の実施態様2のEGIcDNAタグの作成方法を、図3及び4に基づいて示すと次のとおりである。

【0020】

- (1)相補的デオキシリボ核酸(cDNA)を準備し、
- (2)該cDNAをII型制限酵素Csp6Iで切断してcDNA断片を作成し;
- (3)該cDNA断片に、第1IIS型制限酵素BseRI並びに第2IIS型制限酵素BsgIの認識配列を含むリンカーXを連結して、リンカーX-cDNA断片連結物を作成し;
- (4)該リンカーX-cDNA断片連結物を第2IIS型制限酵素BsgIで切断して、リン

カー X-cDNA タグ連結物を作成し;

(5) 必要に応じて該リンカー X-cDNA タグ連結物を純化し;

(6) 必要に応じて該リンカー X-cDNA タグ連結物の cDNA タグの末端を、第 3 IIS 型制限酵素の認識配列を含むリンカー Y が結合可能な状態に処理した後、

(7) 該リンカー X-cDNA タグの第 2 IIS 型制限酵素 BsgI による切断末端に、第 1 IIS 型制限酵素 BseRI の認識配列を含むリンカー Y を連結して、リンカー X-cDNA タグ-リンカー Y 連結物を作成し;

(8) 該リンカー X-cDNA タグ-リンカー Y 連結物を増幅し; かつ

(9) 得られた増幅産物を第 1 IIS 型制限酵素 BseRI で切断して、発現遺伝子同定用 cDNA タグを得て、

(10) 必要に応じて、得られた発現遺伝子同定用 cDNA タグを分離することを含む、EGI cDNA タグの作成方法。

【0021】

なお、説明を容易にするため、実施態様 2 でも各制限酵素を具体的に記載しているが、もちろん、幅広く、様々な制限酵素を使用できる。実施態様 2 で用いるリンカー X は、第 1 IIS 型制限酵素及び第 2 IIS 型制限酵素 BsgI の認識配列を含むリンカーであり、リンカー Y は、リンカー X と同じ第 1 IIS 型制限酵素の認識配列を含むリンカーである。

なお、実施態様 2 で用いるリンカー X、リンカー Y、プライマー X 及びプライマー Y のそれぞれの配列を下記に示す。

【0022】

リンカー X:

5' -...NNNNNNNGAGGAGNGTGCAG...-3' (配列番号 7)

3' -...NNNNNNNCTCCTCNCACGTCAT...-5' (配列番号 8)

リンカー Y:

5' -...ACNNNNNNNCTCCTCNNNNNNN...-3' (配列番号 9)

3' -...NNTGNNNNNNNGAGGAGNNNNNNN...-5' (配列番号 10)

プライマー X:

5' -...NNNNNNNGAGGAGNGTGCAGTAC...-3' (配列番号 11)

プライマー Y:

3' -...TGNNNNNNNGAGGAGNNNNNN...-5' ((配列番号 12)

本発明の実施態様 3 の EGICDNA タグの作成方法を、図 5 及び 6 に基づいて示すと次のとおりである。

【0023】

- (1) 相補的デオキシリボ核酸(cDNA)を準備し、
- (2) 該cDNAをII型制限酵素Csp6Iで切断してcDNA断片を作成し；
- (3) 該cDNA断片に、第1 IIS型制限酵素BseRI及び第2 IIS型制限酵素BsgIの認識配列を含むリンカーXを連結して、リンカーX-cDNA断片連結物を作成し；(4) 該リンカーX-cDNA断片連結物を第2 IIS型制限酵素BsgIで切断して、リンカーX-cDNAタグ連結物を作成し；
- (5) 必要に応じて該リンカーX-cDNAタグ連結物を純化し；
- (6) 必要に応じて該リンカーX-cDNAタグ連結物のcDNAタグの末端を、第3 IIS型制限酵素EciIの認識配列を含むリンカーYが結合可能な状態に処理した後、(7) 該リンカーX-cDNAタグの第2 IIS型制限酵素BsgIによる切断末端に、第3 IIS型制限酵素EciIの認識配列を含むリンカーYを連結して、リンカーX-cDNAタグ-リンカーY連結物を作成し；
- (8) 該リンカーX-cDNAタグ-リンカーY連結物を増幅し；かつ
- (9) 得られた増幅産物を第1 IIS型制限酵素BseRI並びに第3 IIS型制限酵素EciIで切断して、発現遺伝子同定用cDNAタグを得て、
- (10) 必要に応じて、得られた発現遺伝子同定用cDNAタグを分離することを含む、EGICDNAタグの作成方法。

【0024】

なお、説明を容易にするため、実施態様 3 でも各制限酵素を具体的に記載しているが、もちろん、幅広く、様々な制限酵素を使用できる。実施態様 3 で用いるリンカー X は、第 1 IIS 型制限酵素及び第 2 IIS 型制限酵素の認識配列を含むリンカーであり、リンカー Y は、第 3 IIS 型制限酵素の認識配列を含むリンカーである。

さらに、本発明を、実施態様 3 に基づき詳細に説明する。なお、ここに記載す

る制限酵素、処理手順は特に断らない限り、本発明全体に適用することができる。

(1)の工程では、試料となるcDNAを準備する。通常、まず被検細胞からmRNAを調製し、逆転写酵素を用いてcDNAを作成する。該cDNAは、全長mRNAに対応するもの及びそのフラグメントのいずれであってもよい。該被検細胞は、3'末端にポリAテールを有するmRNAを産生する細胞である限り限定されず、動物細胞、植物細胞、微生物細胞等のあらゆる細胞を含む。ウイルス感染した動物細胞、植物細胞、微生物細胞を被検細胞として用いることもできる。

【0025】

本発明では、1 μ g のmRNAがあれば解析を行うことができる。1 μ g のmRNAは、通常1mgの細胞から得られるので、本発明は、ニードルバイオプシーなどで得た貴重な人体組織サンプルなど取り扱う際には特に有効である。

被検細胞からのmRNAの分離は、通常行われる手法により行うことができる。例えば、被検細胞を、グアニジン試薬、フェノール試薬等で処理してトータルRNAを分離後、オリゴdT-セルロースやセファロース2Bを担体とするポリU-セファロース等を用いるアフィニティークラム法やバッチ法等によりmRNAを得る。

次いで、得られたmRNAを鋳型とし、オリゴdTプライマー及び逆転写酵素を用いて、第一鎖cDNA（一本鎖cDNA）を合成後、該第一鎖cDNAを鋳型として第二鎖cDNA（二本鎖cDNA）を合成する。このオリゴdTプライマーとしては、固相固定化オリゴdTプライマー、補酵素標識オリゴdTプライマー等が挙げられるが、再現性や目的DNA断片の回収率の点から、固相固定化オリゴdTプライマーが好ましい。該固相固定化オリゴdTプライマーには、ラテックスビーズ固定化オリゴdTプライマー、マグネットビーズ固定化オリゴdTプライマー等があるが、マグネットビーズ固定化オリゴdTプライマーが好ましい。

【0026】

(2)の工程では、試料中の該cDNAをII型制限酵素で切断してcDNA断片を作成する。

試料中の該cDNAは、固相固定化オリゴdTプライマーに結合した二本鎖cDNAとすることができる。本明細書中の「II型制限酵素」という用語は、所定の認識配列

を認識して、該認識配列の内側又はその隣接した特異的な位置でDNAを切断する制限酵素をいう。本発明で用いるII型制限酵素としては、解析するmRNA中に少なくとも1つは認識配列を有すると考えられるもの、例えば、4、5あるいは6個の塩基からなる認識配列を有するII型制限酵素が好ましい。特にmRNAの平均鎖長が2000塩基である点を考慮すると、4の4乗=256塩基に1つの割合で制限部位が出現し得る4塩基の認識配列を有するII型制限酵素が好ましい。

【0027】

本発明に用いるII型制限酵素の例を挙げると、AfaI, AluI, CfuI, CviRI, DpnI, EsaBC3I, HpyBI, HpyCH4V, HpyF44III, MltI, PlaAII, RsaI, BfaI, Csp6I, CviAII, CviQI, CviRII, FgoI, HpyCH4IV, MaeI, MaeII, MthZI, RmaI, PpaAII, TaqI, Tsp32I, Tsp32II, TthHB8I, XspI, BspKT6I, BstKTI, HpyCH4I, AspMDI, Bce243I, Bfi57I, BfuCI, Bme12I, BscFI, Bsp67I, Bsp105I, Bsp143I, Bsp2095I, BspAI, BspFI, BspJI, Bst19II, BstENII, BtkII, CacI, CcyI, ChaI, CpfI, CviAI, DpnII, FatI, FnuCI, FnuEI, HaeI, Kzo9I, LlaAI, MboI, MgoI, MkrAI, NdeII, NlaII, NmeCI, NphI, RalF40I, Sau3AI, SauMI, Sth368I, ChaI, HnI, Hsp92II, NlaIII, TaiI, TscI, Tsp49I, AccII, BanAI, BceBI, BecAII, BepI, Bim19II, Bme361I, Bpu95I, BseQI, BshI, Bsh1236I, BshFI, Bsp50I, Bsp123I, Bsp211I, BspBRI, BspKI, BspRI, BstFNI, BstUI, Bsu1532I, BsuRI, BtgI, BtkI, CltI, Csp68KVI, CspKVI, DsaII, EsaBC4I, FalII, FauBII, FnuDI, FnuDII, HaeIII, MchAII, MfoAI, MfoAI, MvnI, NgoPII, NspLKI, PalI, Pde133I, PflKI, PlaI, SbvI, SfaI, SuaI, ThaI, AciI, Bco27I, BsiSI, Bst40I, BsuFI, CboI, HapII, Hin2I, Hin6I, HinPII, HpaII, HsoI, HspAI, MnoI, MspI, Pde137I, SciNI, Sth134I, AspLEI, BspLAI, BstHHI, CfoI, FnuDIII, HhaI, SelI, MseI, TruII, Tru9I, Sse9I, TasI, Tsp509I, 及びTspEIがある。

【0028】

これらのII型制限酵素には、認識配列が4塩基 ATCGすべてを含むもの、CGのみを含むもの及びATのみを含むものがある。

認識配列がATCGすべてを含む上記II型制限酵素の例を挙げると、AfaI, AluI, CfuI, CviRI, DpnI, EsaBC3I, HpyBI, HpyCH4V, HpyF44III, MltI, PlaAII, Rsa

I, BfaI, Csp6I, CviAII, CviQI, CviRII, FgoI, HpyCH4IV, MaeI, MaeII, MthZ I, RmaI, PpaAII, Tsp32I, Tsp32II, TaqI, TthHB8I, XspI, BspKT6I, BstKTI, HpyCH4I, AspMDI, Bce243I, Bfi57I, BfuCI, Bme12I, BscFI, Bsp67I, Bsp105I, Bsp143I, Bsp2095I, BspAI, BspFI, BspJI, Bst19II, BstENII, BtkII, CacI, CcyI, ChaI, CpfI, CviAI, DpnII, FatI, FnuCI, FnuEI, HacI, Kzo9I, LlaAI, MboI, MgoI, MkrAI, NdeII, NlaII, NmeCI, NphI, RalF40I, Sau3AI, SauMI, St h368I, ChaI, Hn1III, Hsp92II, NlaIII, TaiI, TscI及びTsp49Iがある。

【0029】

また、認識配列がCGのみを含む該II型制限酵素の例を挙げると、AccII, BanAI, BceBI, BecAII, BepI, Bim19II, Bme361I, Bpu95I, BseQI, BshI, Bsh1236I, BshFI, Bsp50I, Bsp123I, Bsp211I, BspBRI, BspKI, BspRI, BstFNI, BstUI, Bs ul532I, BsuRI, BtgI, BtkI, CltI, Csp68KVI, CspKVI, DsaII, EsaBC4I, FalII, FauBII, FnuDI, FnuDII, HaeIII, MchAII, MfoAI, MfoAI, MvnI, NgoPII, Nsp LKI, PalI, Pde133I, PflKI, PlaI, SbvI, SfaI, SuaI, ThaI, Acil, Bco27I, B siSI, Bst40I, BsuFI, CboI, HapII, Hin2I, Hin6I, HinPII, HpaII, HsoI, Hsp AI, MnoI, MspI, Pde137I, SciNI, Sth134I, AspLEI, BspLAI, BstHHI, CfoI, F nuDIII, HhaI及びSclIがある。また、認識配列がATのみを含むII型制限酵素の例を挙げると、MseI, TruII, Tru9I, Sse9I, TasI, Tsp509I 及びTspEIがある。これらの認識配列の特徴を考慮して、II型制限酵素を選択するのが好ましい。

【0030】

(3)の工程では、該cDNA断片に、第1IIS型制限酵素並びに第2IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーXを連結して、リンカーX-cDNA断片連結物を作成する。

まず、(2)の工程で得られたcDNA断片群から、オリゴdTプライマー配列を含むcDNA断片を分離する。分離は、オリゴdTプライマーの標識を利用して行うことができる。例えば、ラテックスビーズ固定化オリゴdTプライマーを前記cDNAの調製に用いている場合には、II型制限酵素で処理した後、遠心分離することによって、該ビーズに固定されたオリゴdTプライマー配列を含むcDNA断片を沈降、分離することができる。ここで得られるcDNA断片は、mRNAのポリAテールと該ポリAテ

ールから5'上流側に向かって最初に出現する前記II型制限酵素の切断末端部位を含むものである。次いで、該cDNA断片に、リンカーXをDNAリガーゼ（例えば、T4 DNAリガーゼ）を用いて連結する。

【0031】

リンカーXに設定する第1 IIS型制限酵素の認識配列は、第1 IIS型制限酵素がスペーサー配列を残さないよう該cDNAタグを切断する位置、又は所望のスペーサー配列を残すような適切な位置に在るのが好ましい。

例えば、第1 IIS型制限酵素の認識配列としてBseRIの認識配列を含み、第2 IIS型制限酵素の認識配列としてBsgIの認識配列を含み、かつII型制限酵素としてCsp6Iを用いたときに得られるcDNA断片に連結させるリンカーXとしては、次の構造を有する二本鎖DNA断片がある。

5'---NNNNNNNGAGGAGNGTGCAG---3' (配列番号13)

3'---NNNNNNCTCCTCNCACGTCAT---5' (配列番号14)

該リンカーX中の配列「5'-GAGGAG-3'」は第1 IIS型制限酵素BseRIの認識配列である。また該リンカーX中の3'末端配列「5'-GTGCAG-3'」は、第2 IIS型制限酵素BsgIの認識配列である。なお、本明細書中の塩基配列において使用するN又はnは、任意の塩基を意味する。

【0032】

本明細書中で用いる「第1 IIS型制限酵素」という用語は、原則として、リンカーX上の認識配列を認識し、所望のEGIcDNAタグを形成できるIIS型制限酵素及び、同様の機能を発揮するI型及びIII型制限酵素をも含むものである。

該第1 IIS型制限酵素の例を挙げると、MmeI, AcuI, Bce83I, BpmI, BpuEI, BsgI, BspKT5I, Eco57I, Eco57MI, GsuI, BsmFI, BspLU11III, Bst0Z616I, StsI, BceAI, BstPZ418I, FokI, Bcefi, AlwXI, BbvI, Bsp423I, BseKI, BseXI, Bsp423I, Bst12I, Bst71I, BstV1I, RleAI, AceIII, Bbr7I, EciI, TspDTI, TspGWI, Tth111III, HgaI, BseMII, BseRI, BspST5I, LweI, PhaI, SfaNI, AarI, Acc36I, BfuAI, BspMI, BveI, Sth132I, SspD5I, AsuHPI, HphI, MboII, NcuI, MnlI, B

bsI, BbvII, BbsI, Bbv16II, BpiI, BpuAI, Bsc91I, BspBS31I, BspIS4I, BspTS514I, BstBS32I, BstTS5I, BstV2I, Bme585I, BscAI, Bst19I, BstFZ438I, FauI, SmuI BciVI, BfuI, 及びHpyAV がある。

【0033】

これらのうち、認識配列から最長末端までの距離が10塩基以上の第1 IIS型制限酵素には、MmeI, AcuI, Bce83I, BpmI, BpuEI, BsgI, BspKT5I, Eco57I, Eco57MI, GsuI, BsmFI, BspLU11III, BstOZ616I, StsI, BceAI, BstPZ418I, FokI, BcefiI, AlwXI, BbvI, Bsp423I, BseKI, BseXI, Bsp423I, Bst12I, Bst71I, BstV1I, RleAI, AceIII, Bbr7I, EciI, TspDTI, TspGWI, Tth111III, HgaI, BseMII, 及びBseRI がある。また、該距離が16塩基以上の第1 IIS型制限酵素には、MmeI, AcuI, Bce83I, BpmI, BpuEI, BsgI, BspKT5I, Eco57I, Eco57MI及びGsuIがある。

本明細書中で用いる「第2 IIS型制限酵素」という用語は、リンカーX上、又はリンカーX-cDNA断片連結物結合部に形成された認識配列を認識して、cDNA断片の適切な位置を切断するIIS型制限酵素、及び同様の機能を発揮するI型及びIII型制限酵素を含むものである。該第2 IIS型制限酵素の切断により、リンカーXとcDNAタグの連結物が得られる。

【0034】

該第2 IIS型制限酵素の例を挙げると、MmeI, AcuI, Bce83I, BpmI, BpuEI, BsgI, BspKT5I, Eco57I, Eco57MI, GsuI, BsmFI, BspLU11III, BstOZ616I, StsI, BceAI, BstPZ418I, FokI, BcefiI, AlwXI, BbvI, BseKI, BseXI, Bsp423I, Bst12I, Bst71I, BstV1I, RleAI, AceIII, Bbr7I, EciI, TspDTI, TspGWI, Tth111III, HgaI, BseMII, BseRI, BspST5I, LweI, PhaI, SfaNI, AarI, Acc36I, BfuAI, BspMI, BveI, Sth132I, SspD5I, AsuHPI, HphI, MboII, NcuI, MnlI, BbsI, BbvI, BbsI, Bbv16II, BpiI, BpuAI, Bsc91I, BspBS31I, BspIS4I, BspTS514I, BstBS32I, BstTS5I, BstV2I, Bme585I, BscAI, Bst19I, BstFZ438I, FauI, SmuI BciVI, BfuI, 及びHpyAVがある。

【0035】

これらのうち、認識配列から最長末端までの距離が10塩基以上の第2 IIS型制

限酵素には、MmeI, AcuI, Bce83I, BpmI, BpuEI, BsgI, BspKT5I, Eco57I, Eco57MI, GsuI, BsmFI, BspLU11III, BstOZ616I, StsI, BceAI, BstPZ418I, FokI, BceI, AlwXI, BbvI, BseKI, BseXI, Bsp423I, Bst12I, Bst71I, BstVII, RleAI, AceIII, Bbr7I, EciI, TspDTI, TspGWI, Tth111III, HgaI, BseMII及びBseRIがある。また、該距離が16塩基以上の第2 IIS型制限酵素には、MmeI, AcuI, Bce83I, BpmI, BpuEI, BsgI, BspKT5I, Eco57I, Eco57MI, 及びGsuIがある。

なお、第1 IIS型制限酵素は切断部位の配列を限定する必要はないので、第1及び第2のIIS型制限酵素の組み合わせは限定されない。また、リンカーXはII型制限酵素によって形成されるcDNA断片と連結物を形成できる末端を持つか、あるいは連結物を形成できるように末端を加工できなければならないが、II型制限酵素と第1 IIS型制限酵素または第2 IIS型制限酵素との組み合わせは限定されない。

【0036】

また、第1 IIS型制限酵素の正鎖の切断位置が相補鎖の切断位置よりも離れている場合、それらの差の数だけリンカーYにランダム配列を必要とする。該当するIIS型酵素の例を挙げると、MmeI, AcuI, Bce83I, BpmI, BpuEI, BsgI, BspKT5I, Eco57I, Eco57MI, GsuI, RleAI, EciI, TspDTI, TspGWI, Tth111III, BseMII, BseRI, AsuHPI, HphI, MboII, NcuI, MnlI, BciVI, BfuI, 及びHpyAVがある。

(4)の工程では、該リンカーX-cDNA断片連結物を第2 IIS型制限酵素で切断して、リンカーX-cDNAタグ連結物を作成する。

例えば、第2 IIS型制限酵素としてBsgIを用いる場合には、当該酵素は、該リンカーX-cDNA断片連結物に形成された認識配列「5'-GTGCAG-3'」及びその相補鎖からなる二本鎖DNAを認識し、「5'-GTGCAG-3' (16/14)」の位置を切断する。すなわち、BsgIは、認識配列「5'-GTGCAG-3'」の3'末端の塩基Cから3'下流側16番目の塩基と17番目との間のホスホジエステル結合、及び認識配列「5'-GTGCAG-3'」の相補鎖「3'-CTGCAC-5'」の5'末端の塩基Cから5'上流側14番目の塩基と15番目との間のホスホジエステル結合を切断し、以下の構造を有する切断末端を有するDNA断片を生じる。

【0037】

5' -...NNNNNNNGAGGAGNGTGCAGTACNNNNNNNNNN -3' (配列番号 15)

3' -...NNNNNNNCTCCTCNCACGTCATGNNNNNNNNNN-5' (配列番号 16)

(5)の工程では、必要に応じて、(4)の工程で該リンカーX-cDNA断片連結物を第2 IIS型制限酵素で切断して得られた、該リンカーX-cDNAタグ連結物を純化する。この純化は、前記cDNAタグが切除されたcDNA断片残部を、(3)の工程で記載したように、標識オリゴdTプライマーの標識を利用して除去することにより行うことができる。例えば、ラテックスビーズ固定化オリゴdTプライマーを前記cDNAの調製に用いている場合には、ラテックスビーズの沈降性を利用して、制限酵素処理液を遠心分離することによって、標識オリゴdTプライマー配列を含むcDNA断片残部を沈降し、除去することができる。ここで遠心上清には、リンカーX-cDNAタグ連結物が含まれることになる。

【0038】

(6)の工程では、必要に応じて該リンカーX-cDNAタグ連結物の第2 IIS型制限酵素によるcDNAタグの末端を第3 IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーYが結合可能な状態にする。

(7)の工程では、該リンカーX-cDNAタグ連結物の切断末端にリンカーYを連結して、リンカーX-cDNAタグ-リンカーY連結物を作成する。該リンカーYとは、第1又は第3 IIS型制限酵素の認識配列を含むリンカーをいう。また、該認識配列は、第IIS型制限酵素がスペーサー配列を残さないよう該cDNAタグを切断する位置、又は所望のスペーサー配列を残すような適切な位置に在るのが好ましい。例えば、(6)の工程で特に加工を施さなかった場合、連結するリンカーYとしては、下記構造を有するDNA断片がある。この例では、スペーサー配列として、AC2残基が残されるよう設計されている。

【0039】

5' -...NNNNNNNGGCGGANNNNNNNGTNN-3' (配列番号 17)

3' -...NNNNNNNCCGCCTNNNNNNNNCA -5' (配列番号 18)

また、(7)の工程で作成されるリンカーX-cDNAタグ-リンカーY連結物は、例えば、下記の配列を有する。

【0040】

5'---NNNNNNGAGGAGNGTGCAGTACNNNNNNNNNNNNNACNNNNNNNNNTCCGCCNNNNNN-3'

(配列番号19)

3'---NNNNNNCTCCTCNCACGTCATGNNNNNNNNNNNNNTGNNNNNNNNNAGGCGGNNNNNN-5'

(配列番号20)

本明細書中で用いる「第3 IIS型制限酵素」という用語は、第1 IIS型制限酵素に代えて用いる制限酵素であって、リンカーY上の認識配列を認識し、所望のEGIcDNAタグを形成できるIIS型制限酵素及び、同様の機能を発揮するI型及びII型制限酵素をも含むものである。

【0041】

該第3 IIS型制限酵素の例を挙げると、MmeI, AcuI, Bce83I, BpmI, BpuEI, BsgI, BspKT5I, Eco57I, Eco57MI, GsuI, BsmFI, BspLU11III, BstOZ616I, StsI, BceAI, BstPZ418I, FokI, BceFI, AlwXI, BbvI, Bsp423I, BseKI, BseXI, Bsp423I, Bst12I, Bst71I, BstV1I, RleAI, AceIII, Bbr7I, EciI, TspDTI, TspGWI, Tth111III, HgaI, BseMII, BseRI, BspST5I, LweI, PhaI, SfaNI, AarI, Acc36I, BfuAI, BspMI, BveI, Sth132I, SspD5I, AsuHPI, HphI, MboII, NcuI, MnlI, BbsI, BbvII, BbsI, Bbv16II, BpiI, BpuAI, Bsc91I, BspBS31I, BspIS4I, BspTS514I, BstBS32I, BstTS5I, BstV2I, Bme585I, BscAI, Bst19I, BstFZ438I, FauI, SmuI BciVI, BfuI, 及びHpyAV がある。

【0042】

これらのうち、認識配列から最長末端までの距離が10塩基以上の第3 IIS型制限酵素には、MmeI, AcuI, Bce83I, BpmI, BpuEI, BsgI, BspKT5I, Eco57I, Eco57MI, GsuI, BsmFI, BspLU11III, BstOZ616I, StsI, BceAI, BstPZ418I, FokI, BceFI, AlwXI, BbvI, Bsp423I, BseKI, BseXI, Bsp423I, Bst12I, Bst71I, BstV1I, RleAI, AceIII, Bbr7I, EciI, TspDTI, TspGWI, Tth111III, HgaI, BseMII, 及びBseRI がある。また、該距離が16塩基以上の第1 IIS型制限酵素には、Mme

I, AcuI, Bce83I, BpmI, BpuEI, BsgI, BspKT5I, Eco57I, Eco57MI及びGsuIがある。

なお、第1 IIS型制限酵素及び第3 IIS型制限酵素の組み合わせは、同一である場合も含み、限定されない。第1 IIS型制限酵素及び第3 IIS型制限酵素の組み合わせのうち、反応系が同一ないし類似の場合、後述の(9)の工程で第1 IIS型制限酵素及び第3 IIS型制限酵素を同時に働かせ、あるいは酵素及び塩を除去する行程を省略することができる。

【0043】

該工程により、「5'-[リンカーX]-[cDNAタグ(EGIcDNAタグ)]-[リンカーY]-3'」の構造を有する連結物が得られる。

(8)での工程は、該リンカーX-cDNAタグ-リンカーY連結物を増幅する。

(7)の工程で得られる連結物は、リンカーX及びYにそれぞれプライマーX及びYがハイブリダイズする配列を有し、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で容易に増幅することができる。該PCR法は標準的なポリメラーゼ連鎖反応法、例えば、米国特許第4,683,195号に記載されているような方法でよい。さらに、該連結物を原核生物に適合するベクターに組み込むクローニング、又は当業者に公知の他の増幅法により増幅してもよい。

【0044】

なお、末端にプライマーアニール用のリンカーを連結させた多種類の長さの異なるDNAを含む鋳型混合物を用いてPCRを行った場合、増幅効率は各鋳型DNAの鎖長によって異なる。一般に、鎖長が長いほど増幅効率は低く、鎖長が短いほど増幅効率は高い。そのため、得られた増幅産物中の各鋳型DNAに対応する増幅DNA断片の出現比率は、鋳型DNA混合物中の各DNA断片の存在比を反映しない結果となる。しかし、本発明の方法では、鋳型として使用するDNAの混合物は、鎖長が等しく、かつ短いので、得られた増幅産物中の各鋳型DNAに対応する増幅DNA断片の出現比率は、鋳型DNA混合物中の各DNA断片の存在比を反映したものとなる。従って、本発明においては、PCRによる増幅効率の差による影響は理論的に皆無であり、かつ得られる増幅産物中の各cDNA断片の出現比率は、被検細胞中で発現されている各mRNAの比率を反映したものとなる。

【0045】

該PCRは、時間、温度などの条件は、標準的な設定で行なうことができる。なお、本発明で増幅するリンカーX-cDNAタグ-リンカーYは、配列長が短く、長さが均一で増幅効率が高いので、アニール／配列延長サイクル数を減らすことが可能である。また、リンカーの配列を変えるとPCRの効率が変わるので、用いるリンカーによりアニール／配列延長サイクルの所望の効率にすることができる。

【0046】

本明細書中の「プライマーX」という用語は、リンカーXの核酸鎖に相補的で、ポリメラーゼ連鎖反応が誘導される条件下で反応の開始点として作用することができる、天然に存在する、又は合成されたオリゴヌクレオチドを意味する。なお、プライマーXは、リンカーX上の第1 IIS型制限酵素の認識配列を残すことができる位置にハイブリダイズし、かつ重合剤の存在下で増幅を開始させるに足る長さのものでなければならない。該プライマーXに必要な長さは温度、pH、使用するリガーゼなど多くの要因により決まってくるであろう。また同様に、本明細書中で用いる「プライマーY」という用語は、リンカーYの核酸鎖に相補的で、ポリメラーゼ連鎖反応が誘導される条件下で反応の開始点として作用することができる、天然に存在する、又は合成されたオリゴヌクレオチドを意味する。なお、プライマーYは、リンカーY上の第1又は3 IIS型制限酵素の認識配列を残すことができる位置にハイブリダイズし、かつ重合剤の存在下で増幅を開始させるに足る長さのものでなければならない。

なお、当業者であれば、過度の実験を行わなくとも、第1 IIS型制限酵素、第3 IIS型制限酵素等を考慮に入れ、リンカーのヌクレオチド配列に基づいて容易に該増幅用プライマーを作製することができるであろう。

【0047】

実施態様3の(9)工程では、得られた増幅産物を第1 IIS型制限酵素及び第3 IIS型制限酵素で同時に、あるいは必要に応じて酵素及び塩を除去する行程を挟んで順次に切断して、発現遺伝子同定用cDNAタグを作成する。第1 IIS型制限酵素と第3 IIS型制限酵とは、それぞれ独立に選択することができる。また、順次

に切断する場合その順序は制限されない。例えば、第 1 IIS 型制限酵素として BseRI を用いた場合には、該酵素はリンカー X 上の配列「5'-GAGGAG-3'」及びその相補鎖からなる二本鎖 DNA を認識し、「5'-GAGGAG-3' (10/8)」を切断する。すなわち、BseRI は、認識配列「5'-GAGGAG-3'」の 3' 末端の塩基 G から 3' 下流側 10 番目の塩基と 11 番目との間のホスホジエステル結合、及び認識配列 5'-GAGGAG-3' の相補鎖 3'-CTCCTC-5' の 5' 末端の塩基 C から 5' 上流側 8 番目の塩基と 9 番目との間のホスホジエステル結合を切断し、下記構造を有する切断末端を有するリンカー X の DNA 断片を生じる。

【 0 0 4 8 】

5'-...NNNNNNNGAGGAGNGTGCAGTAC-3' (配列番号 2 1)

3'-...NNNNNNNCTCCTCNCACGTCA -5' (配列番号 2 2)

また同様に、第 3 IIS 型制限酵素として EciI を用いた場合には、リンカー Y 上の配列「5'-GGCGGA-3'」及びその相補鎖からなる二本鎖 DNA を認識し、「5'-GGCGGA' (11/9)」を切断する。すなわち、EciI は、認識配列「5'-GGCGGA-3'」の 3' 末端の塩基 G から 3' 下流側 11 番目の塩基と 12 番目との間のホスホジエステル結合、及び認識配列「5'-GGCGGA-3'」の相補鎖 3'-TCCGCC-5' の 5' 末端の塩基 C から 5' 上流側 9 番目の塩基と 10 番目との間のホスホジエステル結合を切断し、下記構造を有する切断末端を有するリンカー Y の DNA 断片を生じる。

【 0 0 4 9 】

5'-...NNNNNNNGGCGGANNNNNNNNGT -3' (配列番号 2 3)

3'-...NNNNNNNCCGCCTNNNNNNNN -5' (配列番号 2 4)

この結果、リンカー X 及び Y を含む DNA 断片から、EGIC DNA タグが切り離されることになる。

【 0 0 5 0 】

すなわち、(2) の工程において、II 型制限酵素として Csp6I を使用し、(3) の工

程において、配列番号13、及び14で表される塩基配列からなるヌクレオチド鎖を含むリンカーXを使用し、(4)の工程において、第2 IIS型制限酵素としてBsgIを使用し、(9)の工程において、配列番号17、及び18で表される塩基配列からなるヌクレオチド鎖を含むリンカーYを使用し、(9)の工程において、第1 IIS型制限酵素としてBseRIを、第3 IIS型制限酵素としてEciIを使用することによって、被検cDNA由来のCsp6I切断部位(5'-AC-3')に隣接するcDNA由来の連続する13塩基のヌクレオチド鎖を含む、下記のEGIcDNAタグが得られる。

【0051】

5'- NNNNNNNNNNNNAC-3' (配列番号 24)

3'-TGNNNNNNNNNNNN -5' (配列番号 26)

細胞由来のmRNAから得たcDNAライブラリーを使用し、本発明の方法を実施した場合、(9)の工程で、EGIcDNAタグのライブラリーが得られる。

【0052】

本発明では、得られた該EGIcDNAタグライブラリーを利用して、EGIcDNAタグ配列に対応するcDNAを定性的、また定量的に測定し、対応する発現遺伝子のパターンを調べることができる。

例えば、検出すべきcDNAに応じたEGIcDNAタグライブラリーを前もって作成し、それをスポットした検出装置に準備しておき、これに異なる標識などでラベルした被検者の試料と標準試料とを接触させ、相対的な信号強度を比較して、ターゲットの選択などを行なうことができる。この標識として蛍光標識、アイソトープなど公知のものを広く使用することができる。

また、例えば、該EGIcDNAタグライブラリーを、検出すべきcDNAなどを固定した検出装置に接触させることにより、該EGIcDNAタグライブラリーに含まれるcDNAを検出して、対応する発現遺伝子のパターンを調べることができる。

本発明で用いることができる検出装置には、DNAチップなどのマイクロアレイと、ドットハイブリダイゼーションなどのマクロアレイがある。該検出装置に用いる支持体には、ナイロンメンブレン、ニトロセルロースフィルター、ガラス板

、シリコンチップなどがある。また、該検出装置とは、例えば、得られたEGIcDNAタグを支持体上に固定し、検出すべきDNA、RNA、及びそのフラグメントなどをハイブリダイズさせて、検出できる装置をいう。

【0053】

なお、mRNAあるいはcDNAを検出できるように標識することが好ましい。例えば、標識としてラジオアイソトープ、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤、または酵素などを使用することができる。

例えば、標識した検出すべきcDNAを一本鎖分子に分離し、必要に応じて段階的に希釈し、そして、例えば、シリコンチップの各グリッド中に、検出すべき遺伝子に対応したEGIcDNAタグを保持した固相支持体と接触させる。得られた遺伝子発現パターンを標準となる遺伝子発現パターンと比較することにより、容易に試料細胞などの状態を知ることができる。また、未知の遺伝子のEGIcDNAタグを固定しておいてパターンを記録しておく、将来この遺伝子が判明したときに、再解析できる。

【0054】

本発明では、第2 IIS型制限酵素の選択により、EGIcDNAタグの長さを調整でき、また遺伝子を解析する生物の種類などにより所望の長さは変わってくるが、一般にEGIcDNAタグの長さは6～25塩基対、さらに10～25塩基対、特に10～16塩基対とするのが好ましい。

(10)の工程では、必要に応じて、得られた発現遺伝子同定用cDNAタグを分離する。当該分離は、当業者が通常使用する方法、例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を利用して行うことができる。

さらに、EGIcDNAタグを互いに連結し、該連結物の塩基配列を決定することにより発現遺伝子を解析することができる。例えば、(9)の工程で得たEGIcDNAタグは3'及び5'の接着末端が相補的であるため、T4リガーゼなどを用いて連結することができる。そして、得られたEGIcDNAタグの連結物(コンカテマー)を当業者に公知な方法、例えば、ベクターに組み込んでクローニングしたり、シーケンサーを用いて配列を読む方法で解析したりすることができる。

【0055】

本発明においては、該コンカテマーは、一般に3～200のEGICDNAタグ、さらに3～80のEGICDNAタグ、特に16～40のEGICDNAタグを含むのが好ましい。なお、得られたコンカテマーには、EGICDNAタグの形成方法により、EGICDNAタグ相互の間にスペーサー配列がないものと、スペーサー配列があるものがある。

本発明のEGICDNAタグ連結物は、例えば、プラスミドやファージのようなベクターに挿入して増幅する標準的な方法でクローニングすることができる。

本明細書の「組換えベクター」という用語は、EGICDNAタグ連結物を挿入し、又は組み込みにより作成されたプラスミド、ウイルスまたは他の運搬体を指す。このようなベクターは、複製起点、プロモーター、及び形質転換細胞の表現型選択を可能とする特定の遺伝子を含むものである。本発明では、公知でシーケンスに適した多くのクローニングベクターを用いることができる。その例を挙げると、pUC18、その改変ベクターpUC118、pUC19、その改変ベクターpUC119、M13mp18 RFI、M13mp19RFI、pBR322、pCR3.1、pBAD-TOP0及びその改良ベクター、及びpBluescript(R)IIなどがある。

【0056】

次に、該組換えベクターを適当な宿主細胞に移入する。本明細書の「宿主細胞」とは、その細胞内でベクターが増殖できかつそのDNAが発現され得る細胞、及び宿主細胞自体の子孫をも意味する。なお、複製の間に突然変異が起こることがあるので、すべての子孫が親細胞と同一であるとは限らない。

また、本発明では外来DNAが宿主内で連続して維持されるような、公知の安定した移入法を用いることができる。例えば、大腸菌のような原核細胞などの宿主を用いる場合は、指数増殖期後に収穫し、続いて公知の手法によるRbCl法、CaCl₂法で処理した細胞から、DNA取込み能のあるコンピテント細胞を調製する。また、エレクトロポレーションや常法により形質転換を行うこともできる。

なお、本発明では、ベクターにEGICDNAタグ連結物を組み込み塩基配列の決定を行うことで、一回の操作で20個以上、20個～100個、好ましくは約20～30個程度のEGICDNAタグの配列を簡単に調べることができる。

【0057】

これまで、本発明の好ましい実施態様について記載してきたが、当業者ならば

これらの記載に基づき、本発明の技術思想を逸脱することなしに種々の改変ができることは明かである。また次に、本発明の実施例を示して具体的に説明するが、これらの実施例は本発明の保護範囲は制限することを意図するものではない。したがって、本発明は特許請求の範囲によってのみ限定されるものである。

【0058】

【実施例】

【実施例1】 末梢血リンパ球細胞の遺伝子発現解析

まず、健常人由来の末梢血から、Nycoprep1.077A (Nyc Med Pharma社製) を用いて、末梢血単球 (PBMC) を集めた。得られた末梢血単球を、 $10\mu\text{g/ml}$ リポ多糖 (LPS) の存在下又は非存在下、 37°C で3時間培養後、それぞれの培養細胞から、Isogen (ニッポンジーン社製) を用いて全RNAを抽出した。得られた全RNA抽出物を、DNaseI (宝酒造社製) で 37°C 30分間処理後、RNeasy (QIAGEN社製) を用いて精製した。次いで、Oligotex-MAG mRNA精製キット (宝酒造社製) を用いて、全RNAからmRNAを吸着により単離後、cDNA合成キット (宝酒造社製) を用いて、mRNAから二本鎖cDNAを調製した。

【0059】

得られた二本鎖cDNAを制限酵素Csp6I (MBI Fermentas社製) で 37°C 2時間処理することで切断した後、磁石によってマグネットビーズ部分を壁面に集め、回収することによって、前記mRNAにおけるポリAテールと該ポリAテールから5'上流側に向かって最初に出現する前記Csp6I認識切断部位との間の塩基配列を含むcDNA断片が存在する画分を得た。次いで、該cDNA断片画分に、T4 DNAリガーゼを用い、次の3つの方法によって、第1 IIS型制限酵素BseRIの認識配列を含むリンカーXを連結した。なお、いずれにおいてもリンカーXの連結は好適に行うことができた。

【0060】

(1) Csp6I切断末端にリンカーXを直接連結する方法

Csp6Iで切断することにより生じた接着末端に、以下の構造を有するリンカーXを直接連結した。

5'-ACCGAGGAGTGTGCAG-3' (配列番号 27)

3'-TGGCTCCTCACACGTCAT-5' (配列番号 28)

次いで、リンカー X に含まれる制限酵素 BsgI の認識配列 5'-GTGCAG-3' を利用して、BsgI (New England Biolabs 社製) での 37℃ 2 時間の切断を行い、今度は前回とは逆にマグネットビーズがない部分、すなわち遠心上清を回収した。この酵素の切断部位は 5'-GTGCAG-3' (16/14) の位置であるから、回収された部分にはリンカーに引き続く cDNA 由来の 13 塩基が含まれることになる (Csp6I 部位由来の共通の TAC 3 残基を除く)。

【0061】

これに以下の構造を有する第二のリンカー Y を、16℃ 2 時間の T4DNA リガーゼ処理により接続した。

5'-ACCACTGCGACTCCGCCTGG-3' (配列番号 29)

3'-NNTGGTGACGCTGAGGCGGACC-5' (配列番号 30)

上記リンカー Y の接続により、両端を既知のリンカーで挟まれた cDNA 由来の 13 塩基対を含む総延長 52 塩基対の DNA の一群「リンカー X-AC-cDNA 由来の 13 塩基対 (EGIcDNA タグ)-AC-リンカー Y」の小断片 cDNA 連結物ライブラリーを得た。この小断片は、以下のような塩基配列及びその相補鎖からなるものである。

【0062】

5'-ACCGAGGAGTGTGCAGTACNNNNNNNNNNNNNACCACTGCGACTCCGCCTGG-3'
(配列番号 31)

次に、この小断片 cDNA 連結物ライブラリーを、リンカー X 部分にハイブリダイズするプライマー X 「5'-ACCGAGGAGTGTGCAGTA-3'」 (配列番号 32) 及びリンカー Y 部分にハイブリダイズするプライマー Y 「5'-CCAGGCGGAGTCGCAGTGGT-3'」 (配列番号 33) を用いて、Taq DNA ポリメラーゼで PCR により増幅した。PCR は、9

6℃で30秒間の変性、50℃で1分間のアニーリング、72℃で1分間の伸長を1サイクルとする合計20サイクルの増幅反応、及び72℃で2分間の最終伸長反応により行った。

【0063】

得られたPCR産物をIIS型制限酵素BseRI (New England Biolabs社製) およびEcoRI (New England Biolabs社製) で処理した。これらの酵素の切断部位は「5'-GAGGAG-3' (10/8)」 および 「5'-GGCGGA-3' (11/9)」 の位置であるから、以下の構造のDNA断片を生じさせた。

5'- NNNNNNNNNNNNAC-3' (配列番号 34)

3'-TGNNNNNNNNNNNN -5' (配列番号 35)

次いで、処理物を12%ポリアクリルアミド電気泳動に供し、リンカー断片と分離して上記小断片DNAを回収した。

【0064】

得られたcDNAタグを再びT4リガーゼで連結後、4.5%ポリアクリルアミド電気泳動に供することによって、500~1000bpの結合断片を回収した。回収された結合断片は、以下の構造を有するものであり、(N)13に隣接する5'-AC-3'もcDNA上のCsp6I認識配列由来の塩基であるから、人為的に付加したスペーサー配列を含まない、完全にcDNA由来のcDNAタグ連結物ライブラリーが得られたことになる。以下の塩基配列中、(N)13はcDNA由来の13塩基5'-NNNNNNNNNNNN-3'を表している。

【0065】

5'-...AC(N)13AC(N)13AC(N)13AC(N)13AC(N)13AC...-3' (配列番号 36)

3'-...TG(N)13TG(N)13TG(N)13TG(N)13TG(N)13TG...-5' (配列番号 37)

上記結合断片をプラスミドpUC118に組み込み、ABI377型DNAシーケンサーにより塩基配列を決定した結果、PBMC細胞及びこれをLPSにより刺激した細胞に特異

的に発現している遺伝子断片を解析することができた。一回の塩基配列決定操作で約20個程度のEGICDNAタグの配列を明らかにできたので、約500サンプルの塩基配列決定を行うことにより、細胞で発現されているmRNAの種類とそれぞれの個数をおおむね明らかにできると考えられる1万個の配列を明らかにできた。

【0066】

表1及び2にこの方法で同定された遺伝子をいくつか示した。これらのEGICDNAタグの塩基配列を既知のデータベースに対し、ホモロジー検索を行った。表1にはLPS刺激により発現が高まる遺伝子を、表2には逆にLPS刺激で発現が抑制される遺伝子を示した。

【0067】

【表 1】

表 1

LPS 刺激によって発現が活性化される遺伝子

mf ID	mf 塩基配列	遺 伝 子 名
11231226	5'-AGGGTCCTTTTGC-3' (配列番号 38)	ヒストン H3.3 の hII3.3B 遺伝子 (Hs. 180877)
65462282	5'-TTGCGTGAAAAGC-3' (配列番号 39)	Arg-セルピン mRNA (プラスミノーゲン 活性化因子インヒビター 2、PAI-2) (Hs. 75716)
22150632	5'-CCCACTTCTGCT-3' (配列番号 40)	未知
55149444	5'-TCAGCGAATGAAT-3' (配列番号 41)	IL-I 受容体アンタゴニスト IL-Ira (IL-IRN) 遺伝子、 完全コード配列 (IIIs. 81134)
17350558	5'-CAAGAGTTTGCTC-3' (配列番号 42)	CCケモカイン LARC 前駆体
58058765	5'-TCTCCTGGAAATA-3' (配列番号 43)	サイトカインサブ ファミリー B (Cys-X-Cys)、 メンバー 10 (SCYA10) mRNA
27500370	5'-CGGATGCTTCCAC-3' (配列番号 44)	インターフェロン制御因子 1 (IRF-1) mRNA
61929620	5'-TGTAATTGAGCAT-3' (配列番号 45)	推定翻訳開始因子 (SUI-1) mRNA
49078651	5'-GTGTATGACCTGG-3' (配列番号 46)	活性化 (Act-2) mRNA 完全 cds (Hs. 75703)
24468063	5'-CCTCCCCGGCCTG-3' (配列番号 47)	JAK 結合タンパク質 (SSI-1) mRNA

【0068】

【表 2】

表 2

LPS 刺激によって発現によって発現が抑制される遺伝子

mf ID	mf 塩基配列	遺 伝 子 名
30790136	5'-CTCCCTCACTTCT-3' (配列番号 48)	ガードナーラッシュドネコ 肉腫ウイルス(v-fgr)ガン遺伝子 子ホモログ(FGR)mMRA
32376076	5'-CTGTGAACCAAGT-3' (配列番号 49)	リボソームタンパク質 L3 (RPL3)mMRA
22677064	5'-CCCGGAACGCACT-3' (配列番号 50)	主要組織適合遺伝子複合体 クラス II、DM α (HLA-DMA)mMRA
17588982	5'-CAATACGAGTTCC-3' (配列番号 51)	アクチン関連タンパク質 2/3 複合体、サブユニット 1B (41Kd) (ARPC1B)、mRNA
58325411	5'-TCTGCTTGCGGAG-3' (配列番号 52)	ザイキシン(ZYX)mRNA
22535845	5'-CCCCTTCTGGGCA-3' (配列番号 53)	G(i)タンパク質 α -サブユニット (アデ ニル酸シクラーゼ阻害 GTP-結合タンパ ク質) (Hs. 77269)mMRA
19476075	5'-CAGGCAGTGCGGG-3' (配列番号 54)	CARD を含有するアポトーシス関連スベ ック様タンパク質(ASC)mRNA
52161694	5'-TACGTTGTAGCTC-3' (配列番号 55)	ミトコンドリア DNA、 完全配列
17076820	5'-CAACAGCAGCCAT-3' (配列番号 56)	造血細胞タンパク質-チロシンキナーゼ (HCK) 遺伝子、完全コード配列、 ラムダー-a2
59268236	5'-TGAGACCTAGAGT-3' (配列番号 57)	ADP/ATP トランスロカーゼ mRNA、3' UTR

【0069】

なお、表 1 及び表 2 中、mf ID として塩基配列の前に示してある数字はコンピューター処理のために 13 塩基を 10 進法の数字により表示したものである。すなわち、mf ID は、塩基配列の各塩基を、a を 0、c を 1、g を 2、t を 3 とそれぞれ読み替えてできた 4 進数を 10 進数に変換し、1 を加えた数である。この ID により、塩基配列を、その長短にかかわらず数字で扱うことができる。例えば

、塩基数 1 4 の塩基配列を扱う場合、次のように数値で特定することができる。

【0 0 7 0】

5'-aaaaaaaaaaaaa-3' 00000001 (又は単に 1)

5'-aaaaaaaaaaaac-3' 00000002 (又は単に 2)

5'-aaaaaaaaaaaag-3' 00000003 (又は単に 3)

5'-aaaaaaaaaaaat-3' 00000004 (又は単に 4)

5'-aaaaaaaaaaca-3' 00000005 (又は単に 5)

.....

.....

5'-tttttttttttgt-3' 67108860

5'-tttttttttttta-3' 67108861

5'-ttttttttttttc-3' 67108862

5'-ttttttttttttg-3' 67108863

5'-ttttttttttttt-3' 67108864

このように該IDにより如何なる13塩基よりなる配列が現れても、全てこれらの9桁の数字の1つに割り当てることができる。これらの数字を小断片ID(mini fragment ID:mf ID)と呼ぶ。

【0 0 7 1】

〔実施例 2〕

実施例 1 で得られたEGICDNAタグライブラリーを、次に述べる検出装置により検出し、遺伝子の発現を解析した。

表 1 記載のLPS刺激により活性化される遺伝子のうち、mfID65462282, 55149444, 17350558, 58058765, 27500370, 及び49078651のmf塩基配列の対応配列を含むオリゴDNAを合成し、常法によりスライドガラスにスポットしてDNAチップを作成した。

実施例 1 で得たLPS刺激末梢血単球 (PBMC) 由来のmRNAを鋳型として蛍光性化合物Cy3-dUTP (*1) (アマシャム・ファルマシア社製) で蛍光標識し、かつLPS無刺激PBMC由来のmRNAを鋳型として蛍光性化合物Cy5-d

UTP (*2) (アマシャム・ファルマシア社製) で蛍光標識しプローブ溶液を得た。

このプローブ溶液を混合し、6×SET [0.9M NaCl、10 μ g/ml Yeast tRNA、0.1%SDS、120mM Tris-HCl (pH7.8)] 中で前記DNAチップと45℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。

洗浄液 [6×SSC、0.1 %SDS] により 52℃で洗浄後、スキャナーを用いて各蛍光物質をスキャンして蛍光強度データを得て、そのデータの解析を行った。各スポットの Cy 3 と Cy 5 とのシグナル強度のスカッタープロット (Scatter Plot) の結果、LPS 刺激を受けた PBMC 由来の mRNA に由来するプローブが発する蛍光は、すべてのスポットにおいて、LPS 無刺激のものよりもシグナル強度が2倍以上強くなった。

【0072】

*1 CAS RN Cy 3 CAS RN 146368-16-3

CN 3H-Indolium, 2-[3-[1-[6-[(2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl)oxy]-6-oxohexyl]-1,3-dihydro-3,3-dimethyl-5-sulfo-2H-indol-2-ylidene]-1-propenyl]-1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfo-, inner salt (9CI) (CA INDEX NAME)

*2 CAS RN Cy 5 CAS RN 146368-14-1

CN 3H-Indolium, 2-[5-[1-[6-[(2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl)oxy]-6-oxohexyl]-1,3-dihydro-3,3-dimethyl-5-sulfo-2H-indol-2-ylidene]-1,3-pentadienyl]-1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfo-, inner salt (9CI)

(CA INDEX NAME)

【実施例3】

実施例1で得られた個々のEGICDNAタグライブラリーの任意のタグを用いて、一組の被検試料における該遺伝子の発現の違いを解析することができる。

【0073】

LPS 刺激刺激末梢血単球 (PBMC) 由来 mRNA、LPS 無刺激 PBMC 由来 mRNA をそれぞれ鋳型として逆転写酵素で調製した cDNA をナイロンメンブレンにそれぞれスポットした後、80℃で2時間処理する。

表1記載の LPS 刺激により発現が誘導される遺伝子のうち mfID65462282 の塩

基配列を含むオリゴDNAを合成し、T4ポリヌクレオチドキナーゼで該DNAを $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ (アマシャム・ファルマシア社製)を用いて ^{32}P (放射性同位体)でラベルしプローブ溶液を得る。

このプローブ溶液を $6\times\text{SET}$ 中で前記ナイロンメンブレンと 45°C で一晩ハイブリダイゼーションを行う。洗浄液 $[6\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%\text{SDS}]$ により 52°C で洗浄後、オートラジオグラフィーを行う。X線フィルム上のシグナルは、LPS刺激PBMCのmRNA由来cDNAのものの方がLPS無刺激PBMCのものよりも2倍以上強くなる。

【0074】

〔実施例4〕

II型制限酵素Csp6Iの代わりにAfaIを用い、第3IIS型制限酵素EciIの代わりにBseRIを用いた他は、実施例1と同様の方法でEGIcDNAタグライブラリーを作成した。まず、下記(1)～(3)のいずれかの方法でリンカーX-cDNA断片連結物を作成する。

(1) 試料中のcDNAを、II型制限酵素AfaIで切断することにより生じた平滑末端に、下記構造を有するリンカーXを直接連結する。

5' - ACCGAGGAGTGTGCAGT - 3' (配列番号58)

3' - TGGCTCCTCACACGTCA - 5' (配列番号59)

(2) 試料中のcDNAを、II型制限酵素AfaIで切断することにより生じた平滑末端に、dATPの存在下で次のように、塩基Aを1個導入する。

【0075】

5' - AC - 3

3' - ATG - 5'

次いで、上記接着末端に、次の構造を有するリンカーXを連結する。

5' - ACCGAGGAGTGTGCAGT-3' (配列番号 60)

3' - TGGCTCCTCACACGTC-5' (配列番号 61)

(3) 試料中のcDNAを、II型制限酵素AfaIで切断することにより生じた平滑末端から、dGTPの存在下で、次のように、塩基Tを1個除去する。

【0076】

5' - AC . . . - 3'

3' - G . . . - 5'

次いで、上記接着末端に、下記構造を有するリンカーXを連結する。

5' - ACCGAGGAGTGTGCAGT - 3' (配列番号 62)

3' - TGGCTCCTCACACGTCAT-5' (配列番号 63)

次いで、リンカーXに含まれる制限酵素BsgIの認識配列5'-GTGCAG-3'を利用して、BsgIで切断を行い、遠心上清を回収した。この酵素の切断部位は5'-GTGCAG-3' (16/14) の位置であるから、回収された部分にはリンカーXに続くcDNA由来の13塩基のタグが含まれることになる。

【0077】

続いて下記構造を有するリンカーYを接続した。続いて、実施例1と同じ方法で増幅し、第1 IIS型制限酵素及び第3 IIS型制限酵素で消化することにより所望のEGIcDNAタグライブラリーを得た。

5' - ACCACTGCGACTCCTCTGG-3' (配列番号 64)

3' - NNTGGTGACGCTGAGGAGACC-5' (配列番号 65)

〔実施例5〕

実施例4で得られたEGIcDNAタグライブラリーを、次に述べる検出装置により検出し、遺伝子の発現を解析することができる。

【0078】

表1記載のLPS刺激により活性化され、かつmfID65462282, 55149444, 17350558, 58058765, 27500370, 及び49078651に対応する遺伝子に対応し、かつ実施例3で得られるEGIcDNAタグの対応配列を含むオリゴDNAを合成し、常法によりスライドガラスにスポットしてDNAチップを作成する。

実施例3で得たLPS刺激末梢血単球(PBMC)由来のmRNAを鋳型として蛍光性化合物Cy3-dUTP(*1)(アマシャム・ファルマシア社製)で蛍光標識し、かつLPS無刺激PBMC由来のmRNAを鋳型として蛍光性化合物Cy5-dUTP(*2)(アマシャム・ファルマシア社製)で蛍光標識しプローブ溶液を得る。

このプローブ溶液を混合し、6×SET [0.9M NaCl、10 μ g/ml Yeast tRNA、0.1%SDS、120mM Tris-HCl(pH7.8)]中で前記DNAチップと45℃で一晩ハイブリダイゼーションを行う。

洗浄液 [6×SSC、0.1 %SDS] により52℃で洗浄後、スキャナーを用いて各蛍光物質をスキャンして蛍光強度データを得て、そのデータの解析を行う。各スポットのCy3とCy5とのシグナル強度のスカッタープロット(Scatter Plot)の結果、LPS刺激を受けたPBMC由来のmRNAに由来するプローブが発する蛍光は、すべてのスポットにおいて、LPS無刺激のものよりもシグナル強度が2倍以上強くなる。

【0079】

【発明の効果】

本発明により、被検cDNA又は被検細胞に特異的に発現している遺伝子を再現性よく正確に検出し、解析することができる。本発明の方法により、任意の二つの細胞における機能、形態上の違いを遺伝子の発現状態の差として明らかにできるので、生理的条件下、あるいは病的状態におけるあらゆる生物現象の解析に広く応用できる。さらに、本発明者らが既に開発した発現遺伝子同定用cDNAタグの作成方法、及び遺伝子発現解析方法よりも、使用できる制限酵素の選択の幅が拡く、使用するリンカーの製造が容易であるなど改良点を有する前記cDNAタグの作成方法、及び遺伝子発現解析方法が得られる。

【0080】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KUREHA CHEMICAL INDUSTRY COMPANY, LIMITED

<120> METHOD FOR PREPARATION OF EXPRESSED GENE IDENTIFICATION CDNA TAG
AND METHOD FOR ANALYSIS OF GENE EXPRESSION

<130> 0701004001

<160> 65

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(7)

<223> n stands for any base

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(18)

<223> n stands for any base

<400> 1

nnnnnnngag gagnnnnngg g

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(8)

<223> n stands for any base

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(21)

<223> n stands for any base

<400> 2

cccnnnnct cctcnnnnnn n

21

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(10)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(23)

<223> n stands for any base.

<400> 3

ccccccccnnn tccgccnnnn nnn

23

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(7)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(22)

<223> n stands for any base.

<400> 4

nnnnnnnggc ggannnnnnn nngt

24

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(7)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(18)

<223> n stands for any base.

<400> 5

nnnnnnngag gagnnnnngg gac

23

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(7)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(22)

<223> n stands for any base.

<400> 6

nnnnnnnggc ggannnnnnn nngt

24

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(7)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n stands for any base.

<400> 7

nnnnnnngag gagngtgcag

20

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(22)

<223> n stands for any base.

<400> 8

tactgcacnc tcctcnnnnn nn

22

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(10)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(23)

<223> n stands for any base.

<400> 9

acnnnnnnnnn ctcctcnnnn nnn

23

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(7)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(21)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(25)

<223> n stands for any base.

<400> 10

nnnnnnngag gagnnnnnnn ngtnn

25

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(7)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n stands for any base.

<400> 11

nnnnnnngag gagngtgcag tac

23

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(7)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(21)

<223> n stands for any base.

<400> 12

nnnnnnngag gagnnnnnn ng

23

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(7)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n stands for any base.

<400> 13

nnnnnnngag gagngtgcag

20

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(22)

<223> n stands for any base.

<400> 14

tactgcacnc tcctcnnnnn nn

22

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(7)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(36)

<223> n stands for any base.

<400> 15

nnnnnnngag gagngtgcag tacnnnnnnn nnnnnn

36

<210> 16

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(11)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)..(34)

<223> n stands for any base.

<400> 16

nnnnnnnnnn ng tactgcac nctcctcnnn nnnn

34

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(7)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(26)

<223> n stands for any base.

<400> 17

nnnnnnnggc ggannnnnnn nngtnn

26

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(11)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(24)

<223> n stands for any base.

<400> 18

acnnnnnnnn ntccgccnnn nnnn

24

<210> 19

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(7)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(36)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (39)..(47)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (54)..(60)

<223> n stands for any base.

<400> 19

nnnnnnngag gagngtgcag tacnnnnnnnn nnnnnnacnn nnnnnntcc gccnnnnnnnn 60

<210> 20

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(7)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(36)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (39)..(47)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (54)..(60)

<223> n stands for any base.

<400> 20

nnnnnnnctc ctncacgtc atgnnnnnnn nnnnnntggn nnnnnnnagg cggnnnnnnn 60

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(7)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n stands for any base.

<400> 21

nnnnnnngag gagngtgcag tac

23

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(21)

<223> n stands for any base.

<400> 22

actgcacnct cctcnnnnnn n

21

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(7)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(22)

<223> n stands for any base.

<400> 23

nnnnnnnggc ggannnnnnn nngt

24

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(9)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(22)

<223> n stands for any base.

<400> 24

nnnnnnnnnt ccgccnnnnn nn

22

<210> 25

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> n stands for any base.

<400> 25

nnnnnnnnnn nnnac

15

<210> 26

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> n stands for any base.

<400> 26

nnnnnnnnnn nnngt

15

<210> 27

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 27

accgaggagt gtgcag

16

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 28

tactgcacac tcctcggt

18

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 29

accactgcga ctccgcctgg

20

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(22)

<223> n stands for any base.

<400> 30

ccaggcggag tcgcagtggg nn

22

<210> 31

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(32)

<223> n stands for any base.

<400> 31

accgaggagt gtgcagtacn nnnnnnnnnn nnaccactgc gactccgcct gg

52

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 32

accgaggagt gtgcagta

18

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 33
ccaggcggag tcgcagtgtg 20

<210> 34
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(13)
<223> n stands for any base.

<400> 34
nnnnnnnnnn nnnac 15

<210> 35
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> n stands for any base.

<400> 35

nnnnnnnnnn nnngt

15

<210> 36

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(15)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(30)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (33)..(45)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (48)..(60)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (63)..(75)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (78)..(90)

<223> n stands for any base.

<400> 36

acnnnnnnnn nnnnnacnnn nnnnnnnnnn acnnnnnnnn nnnnnacnnn nnnnnnnnnn 60

acnnnnnnnn nnnnnacnnn nnnnnnnnnn ac 92

<210> 37

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(15)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(30)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (33)..(45)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (48)..(60)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (63)..(75)

<223> n stands for any base.

<220>

<221> misc_feature

<222> (78)..(90)

<223> n stands for any base.

<400> 37

gtnnnnnnnn nnnngtnnn nnnnnnnnnn gtnnnnnnnn nnnngtnnn nnnnnnnnnn 60

gtnnnnnnnn nnnngtnnn nnnnnnnnnn gt 92

<210> 38

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

agggtccttt tgc 13

<210> 39

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

ttgcgtgaaa agc

13

<210> 40

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 40

cccactttct gct

13

<210> 41

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

tcagcgaatg aat

13

<210> 42

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

caagagtttg ctc

13

<210> 43

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

tctcctggaa ata

13

<210> 44

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

cggatgcttc cac

13

<210> 45

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

tgtaattgag cat

13

<210> 46

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

gtgtatgacc tgg

13

<210> 47

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

cctccccggc ctg

13

<210> 48

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

ctccctcact tct

13

<210> 49

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

ctgtgaacca agt

13

<210> 50

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 50

cccggaacgc act

13

<210> 51

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

caatacgagt tcc

13

<210> 52

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

tctgcttgcg gag

13

<210> 53

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 53

ccccttctgg gca

13

<210> 54

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 54

caggcagtgc ggg

13

<210> 55

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 55

tacgtttag ctc

13

<210> 56

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 56

caacagcagc cat

13

<210> 57

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 57

tgagacctag agt

13

<210> 58

<211> 17

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 58

accgaggagt gtgcagt

17

<210> 59

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 59

actgcacact cctcgggt

17

<210> 60

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 60

accgaggagt gtgcagt

17

<210> 61

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 61

ctgcacactc ctcgggt

16

<210> 62

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 62

accgaggagt gtgcagt

17

<210> 63

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 63

tactgcacac tcctcggt

18

<210> 64

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 64

accactgcga ctctctctgg

19

<210> 65

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> n stands for any base.

<400> 65

ccagaggagt cgcagtggtn n

21

【図面の簡単な説明】

各図は、本発明における発現遺伝子同定用cDNAタグ作成方法の実施態様の工程を示す工程図である。

【図 1】

第 3 IIS 型制限酵素の認識配列を含むリンカー Y を用いる、本発明の EGI cDNA タグの作成方法の工程(1)～(6)を示す図である。

【図 2】

第 3 IIS 型制限酵素の認識配列を含むリンカー Y を用いる、本発明の EGI cDNA タグの作成方法の工程(7)～(10)を示す図である。

【図 3】

第 1 IIS 型制限酵素及び第 2 IIS 型制限酵素の認識配列を含むリンカー X を用いる、本発明の EGI cDNA タグの作成方法の工程(1)～(6)を示す図である。

【図 4】

第 1 IIS 型制限酵素及び第 2 IIS 型制限酵素の認識配列を含むリンカー X を用いる、本発明の EGI cDNA タグの作成方法の工程(7)～(10)を示す図である。

【図 5】

第 1 IIS 型制限酵素及び第 2 IIS 型制限酵素の認識配列を含むリンカー X、並びに第 3 IIS 型制限酵素の認識配列を含むリンカー Y を用いる、本発明の EGI cDNA タグの作成方法の工程 (1) ~ (6) を示す図である。

【図 6】

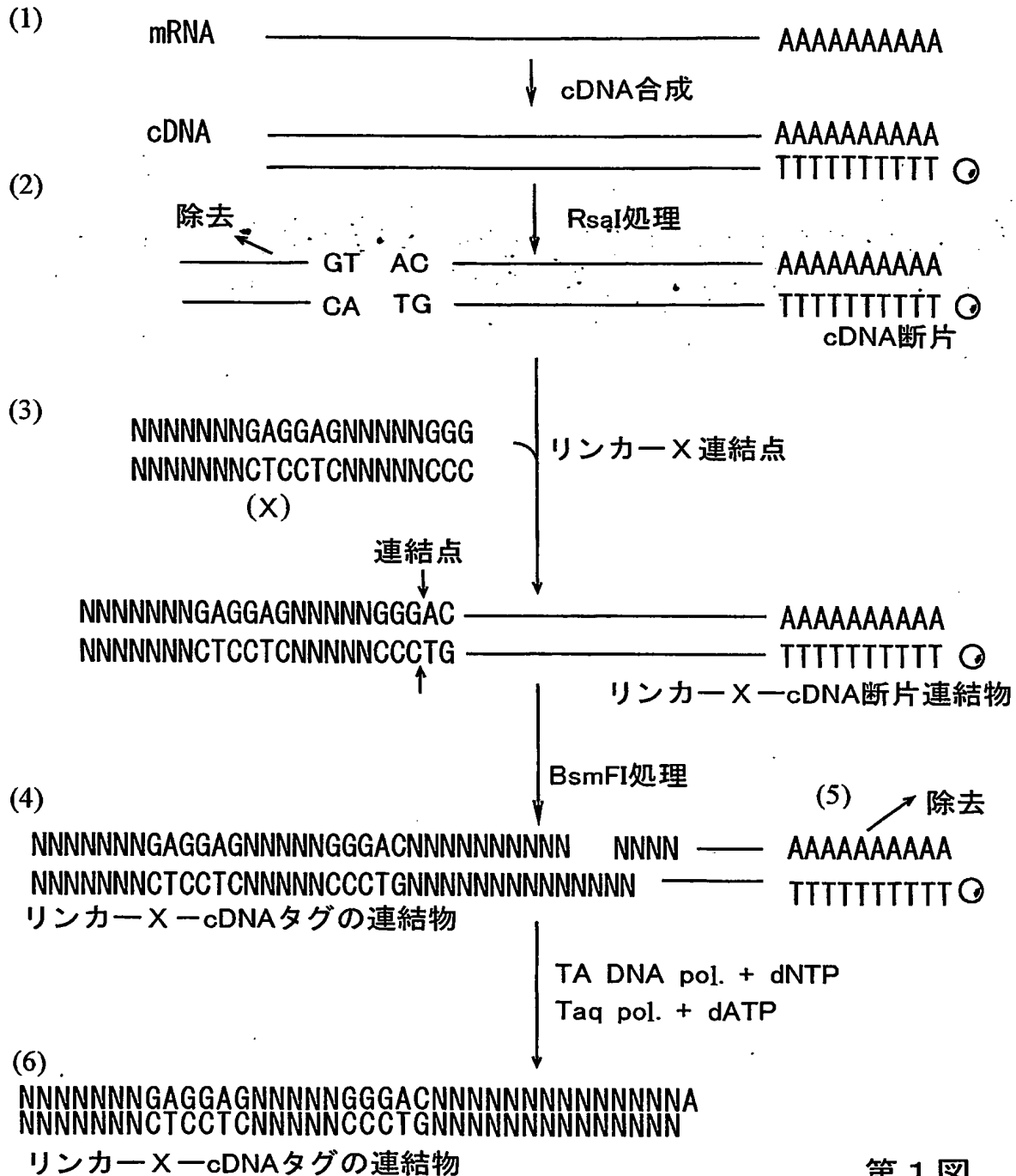
第 1 IIS 型制限酵素及び第 2 IIS 型制限酵素の認識配列を含むリンカー X、並びに第 3 IIS 型制限酵素の認識配列を含むリンカー Y を用いる、本発明の EGI cDNA タグの作成方法の工程 (7) ~ (10) を示す図である。

【符号の説明】

N ... A、T、C又はGから選ばれる任意の塩基を示す。

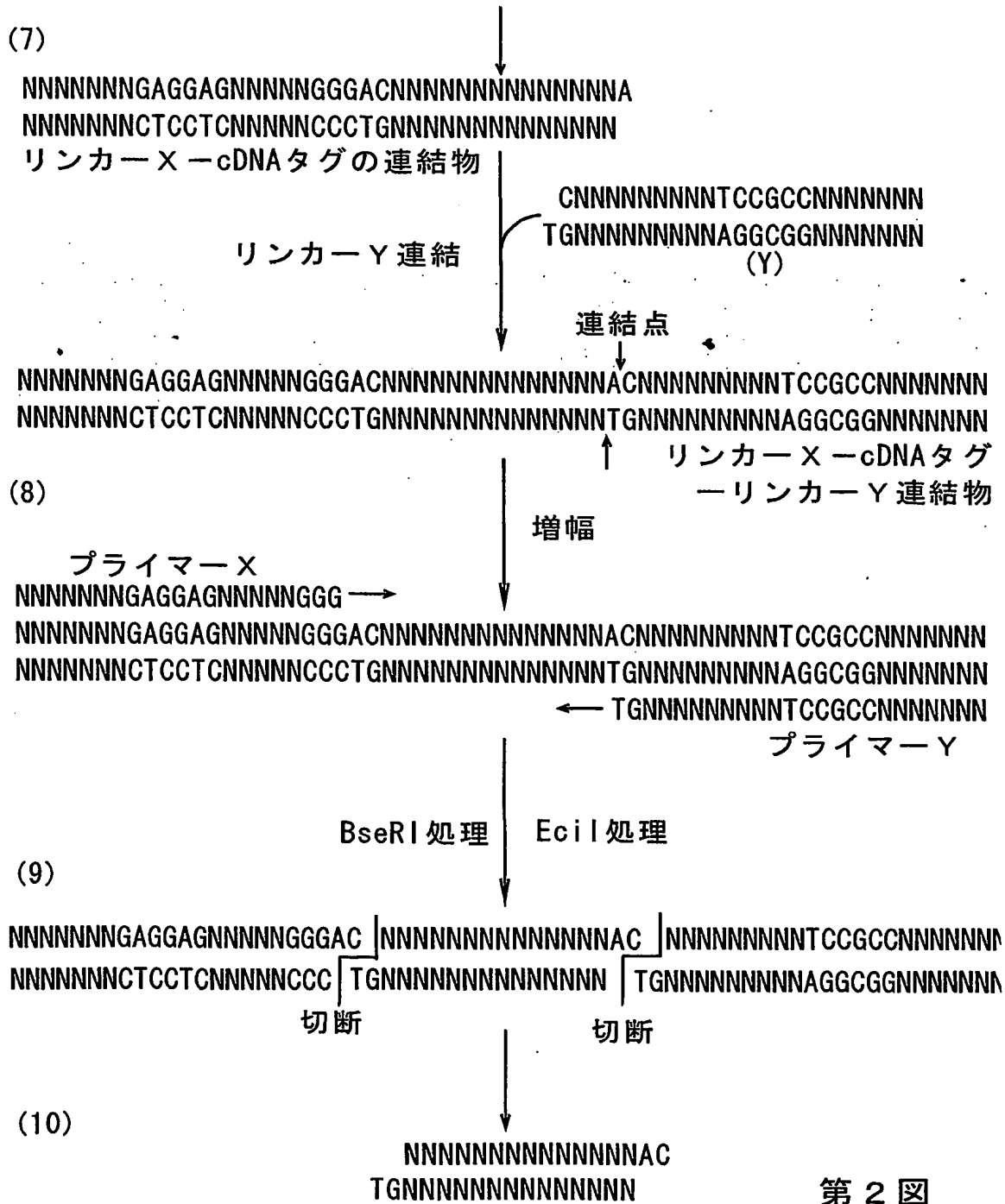
【書類名】 図面

【図 1】

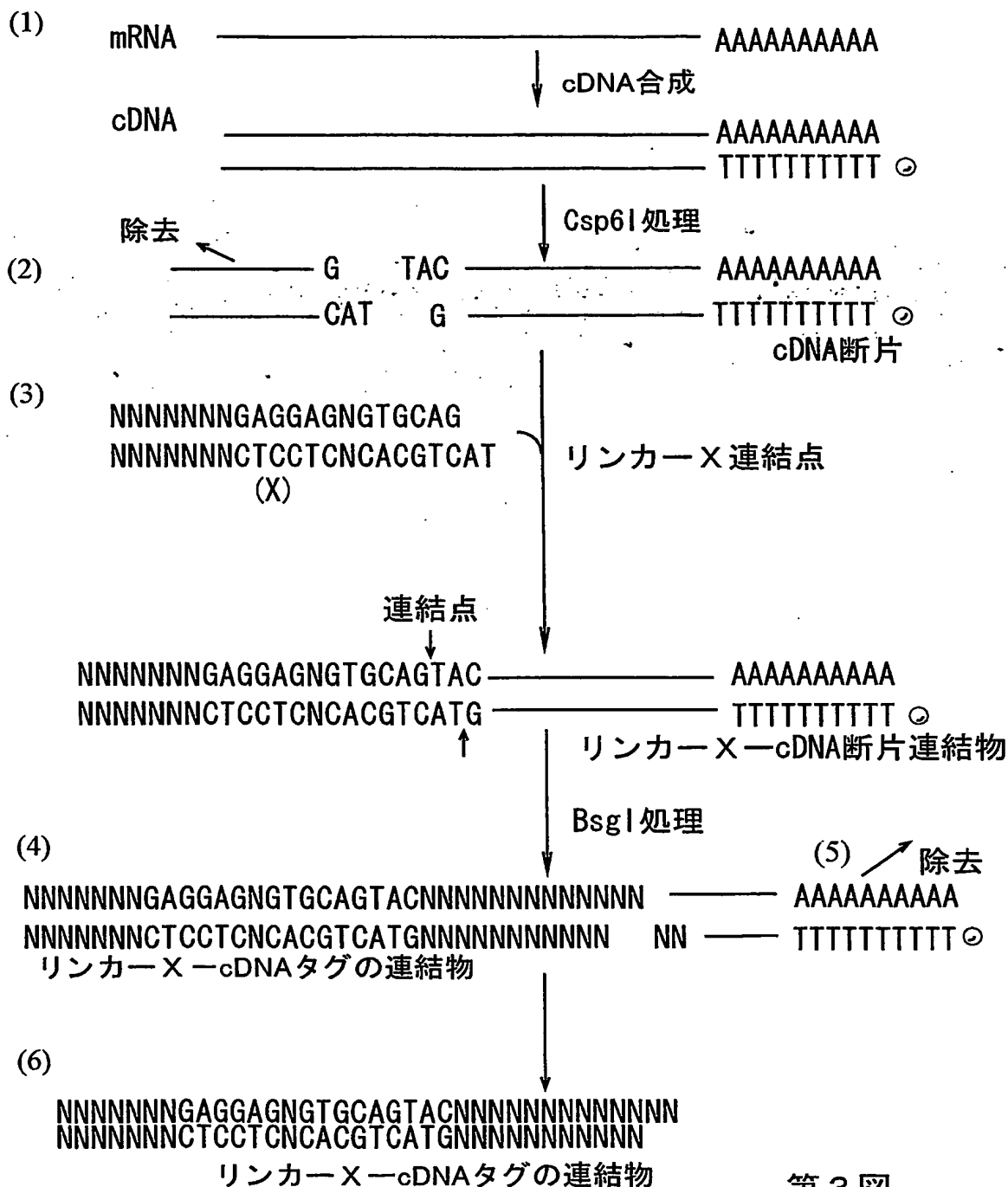


第 1 図

【図 2】

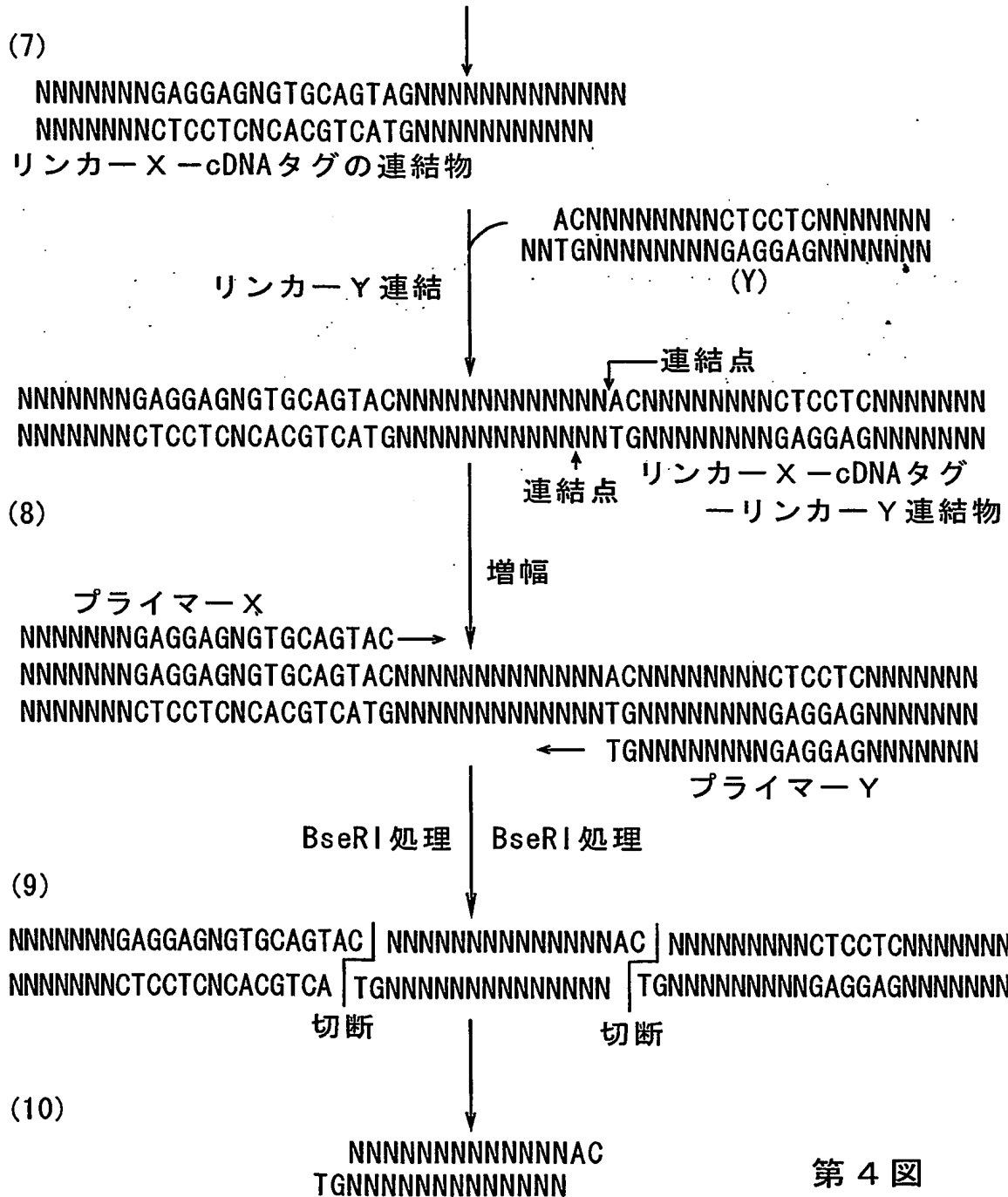


【図 3】

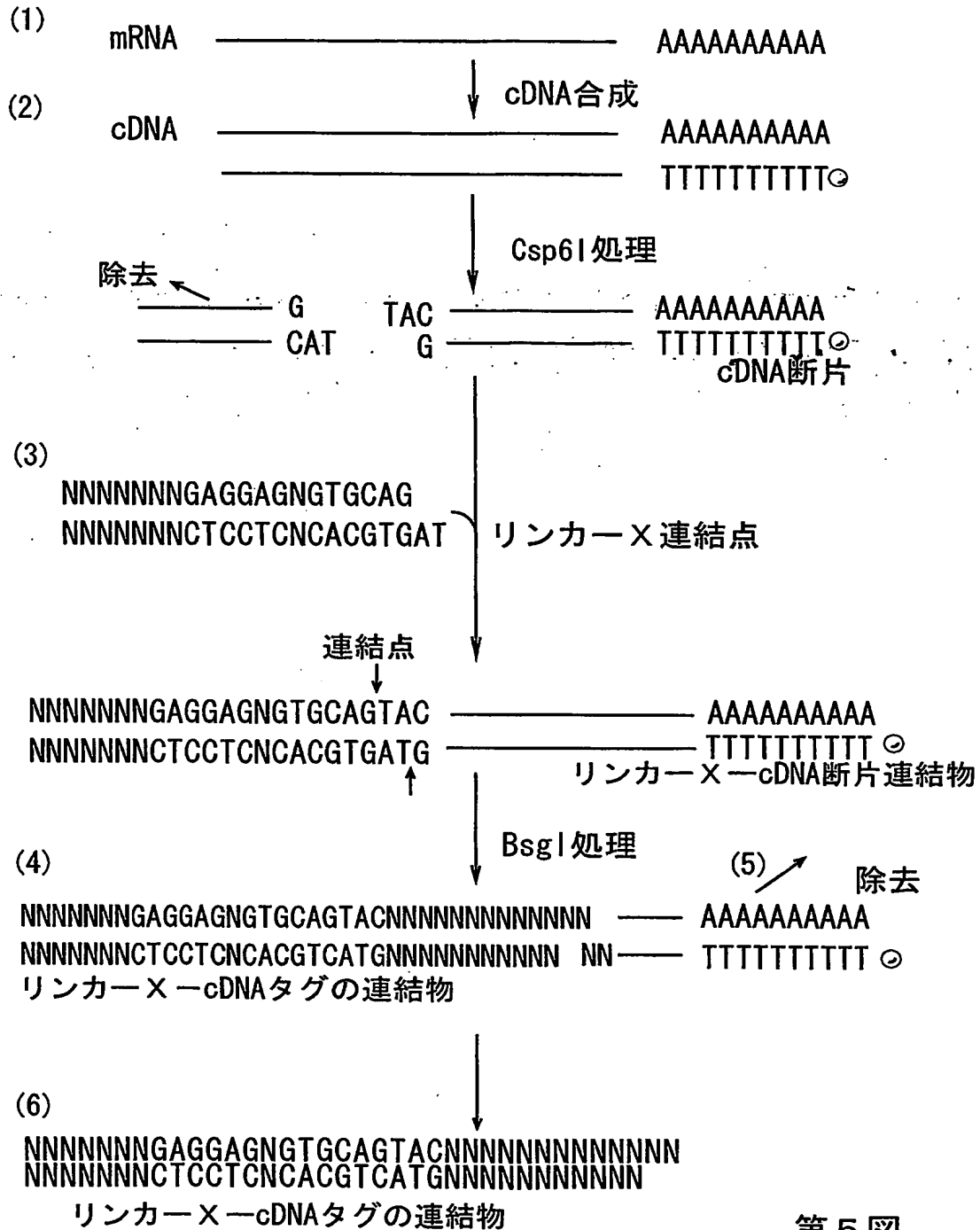


第 3 図

【図 4】

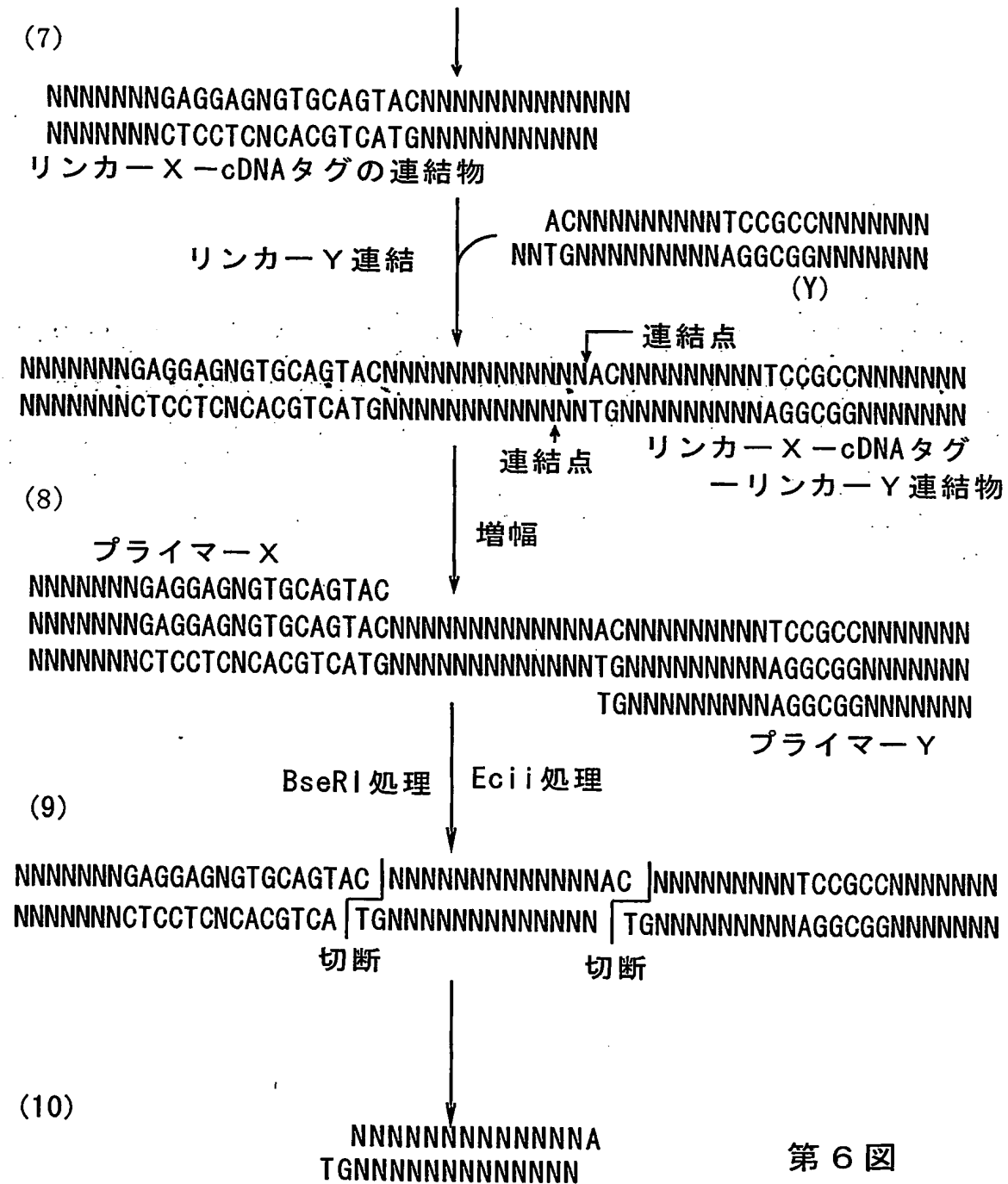


【図 5】



第 5 図

【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 発現遺伝子同定用cDNAタグの作成方法、及び遺伝子発現解析方法を提供する。

【解決手段】 1種類のII型制限酵素、3種類のIIS型制限酵素、該3種類のIIS型制限酵素を利用し、第1、及び第2の酵素の認識配列を含むリンカーX、並びに第3の酵素の認識配列を含むリンカーYを組み合わせることで発現遺伝子同定用cDNAタグを作成する。

【効果】 該cDNAタグをそのまま又は連結工程等を実施して連結物を得て、発現遺伝子の解析を効率的に行なことができる。

【選択図】 なし

特願 2002-267163

出願人履歴情報

識別番号

[000001100]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋堀留町1丁目9番11号

氏 名

呉羽化学工業株式会社

特願2002-267163

出願人履歴情報

識別番号

[391048371]

1. 変更年月日

1991年 7月10日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県所沢市並木3丁目2番地 防衛医科大学校所沢宿舎4-503

氏 名

山本 三毅夫

特願2002-267163

出願人履歴情報

識別番号

[598002121]

1. 変更年月日

1998年 1月 6日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都大田区南千束2丁目16番5号

氏 名

山本 直樹